

# Entwicklung und Anwendung von Strategien zur Expansion pluripotenter Stammzellen

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation von

M.Sc. Magda Tomala

geboren am 20.01.1982 in Krakau

Hannover, März 2010

Referent

Prof. Dr. Thomas Scheper

Institut für Technische Chemie

Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Korreferentin

PD Dr. Cornelia Kasper

Institut für Technische Chemie

Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Tag der Promotion: 12.05.2010

Hierdurch erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden. Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, März 2010

Magda Tomala

## Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2007 bis März 2010 am Institut für Technische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper durchgeführt.

Ich möchte mich ganz herzlich für sein durchgehendes Engagement sowie für die Förderung meines Studiums und meiner Promotion bedanken, durch die mir zahlreiche Wege der Weiterbildung sowie spannende Forschungsaufenthalte im Ausland ermöglicht wurden.

Frau PD Dr. Cornelia Kasper möchte ich für die Übernahme des Korreferats und die Überlassung des interessanten Promotionsthemas, das ich bearbeiten durfte, herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. Martijn van Griensven danke ich für die nette Hilfsbereitschaft bei zell- und molekularbiologischen Fragestellungen sowie für die Bereiterklärung zum Drittprüfer.

Frau Dr. Ursula Rinas danke ich für die hervorragende fachliche Betreuung. Ich habe sehr viel gelernt. Herrn Dr. Frank Stahl möchte ich für die kompetente Hilfsbereitschaft sowie für seine aufmunternden und motivierenden Worte danken. Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Dr. Axel Schambach für die Klonierung des LIF-Plasmids sowie für die freundliche Zusammenarbeit.

Bei Frau Martina Weiss und Herrn Martin Pähler möchte ich mich sehr für die durchgehende Hilfe bedanken- ohne euch wäre ich so oft verzweifelt! Danke!

Der TCI-Werkstatt möchte ich für die Anfertigung der Spinnerflaschen sehr danken.

Chen Ran, Selvihan Özmen, Katja Kühbach, Yangxi Zhao, Ana Leticia Vanz, Maria Zahid, Henrik Neubacher, Nina Bahnmann und Sanketha Kenthirapalan danke ich sehr für die engagierte Hilfsbereitschaft im Labor. Es war mir eine große Freude, mit euch zusammenzuarbeiten!

Sabrina Schmeckeber von der Klinik für Herz-, Thorax-, Transplantations- und Gefäßchirurgie, meiner lieben „Bio-Freundin“, möchte ich ganz ganz ganz herzlich für ihre große Hilfsbereitschaft und menschliche Wärme danken.

Antonina Lavrentieva danke ich für die gleichermaßen enthusiastische sowie fachliche Unterstützung während der vielen gemeinsamen Labormonate. Tonya, du weißt hoffentlich, wie froh ich war, dass du da warst!!! Ta maja padrug!

Allen weiteren Kollegen des TCI möchte ich für das ganz besondere Arbeitsklima danken, dies gilt auch und vor allem den Bewohnern des Hühnerstalls; danke!!

Pierro, je ne sais pas comment te remercier... pour tout le soutien et le courage que tu m'as donné. Sans toi non plus je ne réussirais pas. Maxi zoub.

Meinen Eltern möchte ich ganz herzlich für die durchgehende Hilfe danken, sowie dass sie mich jederzeit unterstützt haben. Dziękuję Wam Eli i Edi.

## Zusammenfassung

Im Hinblick auf ihren Einsatz im *Tissue Engineering* oder in der Wirkstofftestung werden Stammzellen in großer Menge und hoher Qualität benötigt. Aus diesem Grund ist die Entwicklung standardisierter und kontrollierbarer Bioprozesse zur Expansion von Stammzellen notwendig, um die Verfügbarkeit der Zellen sicherzustellen. Darüber hinaus sind Medienzusätze wie Zytokine oder Wachstumsfaktoren notwendig, um die Zellen expandieren zu können. Durch die Supplementierung des Kulturmediums mit biologisch aktiven Zytokinen können insbesondere bei *large scale* Prozessen hohe Kosten anfallen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Produktions- und Aufreinigungsprozesse für die Zytokine *Fibroblast Growth Factor-2* (FGF-2) sowie *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF) unter Verwendung rekombinanter *E. coli* Stämme durchgeführt. Während FGF-2 als matures, lösliches Protein exprimiert wurde, ist für LIF ein Expressionsvektor konstruiert worden, der eine Expression löslichen LIF-Proteins in Fusion mit Thioredoxin ermöglichte. Nach der Entwicklung einer chromatographischen Reinigungsstrategie der Proteine wurden Untersuchungen zur biologischen Aktivität durchgeführt. PC-12 Zellen reagierten mit der Bildung von Neuritenausläufern, während die Proliferation von NIH-3T3 Zellen durch FGF-2 positiv stimuliert wurde. Die Aktivität des hLIF wurde anhand von murinen embryonalen und induzierten pluripotenten Stammzellen (ES- und iPS-Zellen) erfolgreich nachgewiesen. So zeigten beide Zelllinien unverminderte Proliferation unter Erhalt ihrer Pluripotenz.

Darüber hinaus wurden verschiedene Kultivierungssysteme auf ihre Eignung zur effizienten Expansion von ES-Zellen untersucht. Hierfür wurde zunächst eine murine ES-Zelllinie aus adhärenter Feederzell-Ko-Kultur an Feederzell-freie Suspensionsbedingungen adaptiert. Die ES-Zellen wurden anschließend unter statischen sowie dynamischen Bedingungen unter Verwendung verschiedener Suspensionskultivierungssysteme charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Morphologie von Zellsphären sowie die Proliferation der Zellen vom eingesetzten Kultivierungssystem abhängen. Es wurde ein Zusammenhang zwischen der Sphärengröße und Proliferation festgestellt, wobei eine proliferative ES-Zellpopulation aus zahlreichen kleinen Sphären besteht, während große Sphären mit geringem Zellwachstum einhergehen. Die unterschiedliche Sphärengröße ist dabei vermutlich auf unterschiedliche Durchmischungsverhältnisse in den verschiedenen Systemen zurückzuführen. Ferner wurde gezeigt, dass weder der pluripotente Phänotyp noch das Differenzierungspotential der ES-Zellen von den Kultivierungssystemen beeinflusst wurden. Schließlich konnte gezeigt werden, dass auch iPS-Zellen unter Suspensionsbedingungen im undifferenzierten Zustand expandiert werden konnten. Dynamische Kultivierungen zeigten jedoch keine eindeutige Vermehrung der Zellen, so dass weitere Optimierungen der Kultivierungsbedingungen durchgeführt werden müssen.

Schlagworte: rekombinante Zytokine, pluripotente Stammzellen, Suspensionskultur

## Abstract

With regard to tissue engineering or drug screening applications, large amounts of high quality stem cells are required. Therefore, the development of standardized and reproducible bioprocesses is needed to provide a sufficient amount of cells. Additionally, the implementation of bioprocesses for the expansion of stem cells depends on the supplementation of bioactive cytokines to the culture medium. Particularly with respect to cultivations on a clinical or industrial scale, the requirement for cytokines can become a financial bottleneck of the process

In the present work, production and purification processes based on recombinant *E. coli* strains were developed for the cytokines Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) and Leukemia Inhibitory Factor (LIF). Whereas FGF-2 could be expressed as a mature soluble protein, an expression vector was designed to allow an expression of soluble LIF protein in fusion with thioredoxin. After the development of a purification strategy for the proteins, cell based assays were conducted to determine their biological activity. PC-12 cells were induced to neurite outgrowth while the proliferation of NIH-3T3 cells was positively stimulated after FGF-2 treatment. The biological activity of LIF was demonstrated using murine embryonic and induced pluripotent stem cells (ES and iPS cells). It was shown that both cell types could be expanded without the loss of pluripotency in the presence of the purified cytokine.

Furthermore, different cultivation systems were investigated with respect to the ability to efficiently expand ES cells. For this purpose, an adherently growing, feeder cell dependent murine ES cell line was adapted to feeder cell free suspension conditions and characterized using static and dynamic suspension cultivation systems. It was demonstrated that morphology and cell proliferation highly depend on the design of the cultivation system most likely due to unequal fluid flow within the systems. In this context, efficiency of ES cell expansion is correlated to the mean size of generated cell spheres revealing highly proliferating cells within small sized spheres whereas low proliferation was observed in large sized spheres. In all investigated cultivation systems the expanded ES cells retained high and comparable levels of pluripotency marker expression as well as a differentiation potential that was unaffected by the different cultivation systems.

Finally, iPS cells were successfully expanded under static feeder cell free suspension conditions maintaining their unchanged pluripotent phenotype. However, dynamic suspension cultivations failed to propagate the iPS cells requiring further optimization of the cultivation conditions.

**Key words:** recombinant cytokines, pluripotent stem cells, suspension culture

## Abkürzungsverzeichnis

AP	Alkalische Phosphatase
B-CIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-Phosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	<i>complementary</i> DNA, komplementäre cDNA
DAPI	4'6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EB	<i>Embryoid Body</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
FCS	<i>Foetal Calf Serum</i> , fötales Kälberserum
FGF-2	<i>Fibroblast Growth Factor-2</i> , Fibroblastenwachstumsfaktor-2
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> , Grün fluoreszierendes Protein
hES-Zellen	humane embryonale Stammzellen
His	Histidin
HOS	<i>Horse serum</i> , Pferdeserum
IDA	<i>Iminodiacetic acid</i> , Iminodiessigsäure
IEX	<i>Ion Exchange Chromatography</i> , Ionenaustauschchromatographie
IGF	<i>Insulin Growth Factor</i> , Insulin-Wachstumsfaktor
Il-6	Interleukin-6
Il-6R	Interleukin-6 Rezeptor
IMAC	<i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i> , Immobilisierte Metallchelataffinitätschromatographie
iPS-Zellen	induzierte pluripotente Stammzellen
JAK	Januskinase
kDa	kilo Dalton
LB	Luria Bertani
LIF	<i>Leukemia Inhibitory Factor</i> , Leukämie inhibierender Faktor

MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
mES-Zellen	murine embryonale Stammzellen
M-MLV	<i>Moloney-Murine Leukemia Virus</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i> , Nervenwachstumsfaktor
NIH	<i>National Institute of Health</i>
NBT	<i>Nitroblue-Tetrazolium</i>
Oct-3/4	<i>Octamer binding transcription factor-3/4</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , Phosphat gepufferte Saline
PC	Phäochromocytoma
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase Kettenreaktion
PLL	Poly-L-Lysin
RNase	Ribonuklease
RPMI	<i>Rooswell Park Memorial Institute</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SSEA-1	<i>Stage Specific Embryonic Antigen-1</i>
STAT-3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TAE	Tris Acetat EDTA
TB	<i>Terrific Broth</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor-<math>\beta</math></i> , Transformierender Wachstumsfaktor- $\beta$
TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i> , Tabak-Ätz-Virus
trx	Thioredoxin
UV	Ultra Violett



## Inhaltsverzeichnis

<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>I</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>II</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>III</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>V</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN</b> .....	<b>4</b>
2.1 STAMMZELLEN .....	4
2.1.1 Embryonale Stammzellen.....	4
2.1.1.1 Zellkulturtechniken für embryonale Stammzellen.....	6
2.1.2 Suspensionskulturen embryonaler Stammzellen.....	10
2.1.3 Differenzierung von embryonalen Stammzellen .....	14
2.1.4 Induzierte pluripotente Stammzellen .....	16
2.2 ZYTOKINE IN DER STAMMZELLKULTIVIERUNG .....	19
2.2.1 Definition und Wirkweise von Zytokinen .....	19
2.2.2 Expression von Zytokinen in heterologen Systemen .....	21
2.2.3 Strategien zur Erzeugung löslichen Zielproteins.....	21
<b>3 BEREITSTELLUNG VON ZYTOKINEN FÜR DIE STAMMZELLKULTIVIERUNG</b> .....	<b>24</b>
3.1 PRODUKTION VON HUMAN FIBROBLAST GROWTH FACTOR-2 .....	24
3.1.1 Expression von hFGF-2 in <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	25
3.1.2 Aufreinigung von hFGF-2 mittels Kationenaustauschchromatographie (IEX).....	26
3.1.3 Affinitätschromatographie von hFGF-2 mittels Heparin .....	27
3.1.4 Testung der biologischen Aktivität von hFGF-2.....	29
3.1.4.1 Testung der biologischen Aktivität mit PC-12 Zellen .....	29
3.1.4.2 Testung der biologischen Aktivität mit NIH-3T3 Zellen.....	30
3.1.5 Zusammenfassung und Diskussion des Produktionsprozesses für hFGF-2.....	33
3.2 PRODUKTION VON HUMAN LEUKEMIA INHIBITORY FACTOR.....	35
3.2.1 Konstruktion des Expressionsvektors zur Produktion von hLIF.....	35
3.2.2 Expression von hLIF als Fusionsprotein in <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	37
3.2.3 Metallchelataffinitätschromatographie (IMAC) des Fusionsproteins .....	38
3.2.4 Proteolytische Spaltung des Fusionsproteins <i>trx-his-tev-hLIF</i> .....	41
3.2.5 Aufreinigung von hLIF .....	42
3.2.6 Nachweis von hLIF mittels Western Blot.....	45
3.2.7 Testung der biologischen Aktivität von hLIF.....	46
3.2.7.1 Testung der biologischen Aktivität mit murinen embryonalen Stammzellen Brachyury.....	46
3.2.7.2 Testung der biologischen Aktivität mit induzierten pluripotenten Stammzellen YM100.....	50
3.2.8 Produktion von Tobacco Etch Virus Protease.....	52
3.2.8.1 Expression von TEV-Protease in <i>E. coli</i> Rosetta pLysS (DE3).....	52
3.2.8.2 Metallchelataffinitätschromatographie .....	53
3.2.8.3 Aktivitätsbestimmung der TEV-Protease .....	55

3.2.8.4	Zusammenfassung des Produktionsprozesses der TEV-Protease .....	57
3.2.9	Zusammenfassung und Diskussion des Produktionsprozesses für hLIF.....	58
<b>4</b>	<b>ENTWICKLUNG UND ANWENDUNG VON SUSPENSIONSSYSTEMEN FÜR DIE KULTIVIERUNG EMBRYONALER STAMMZELLEN .....</b>	<b>60</b>
4.1	ADAPTATION VON BRACHYURY ES-ZELLEN AN SUSPENDIERTE BEDINGUNGEN .....	61
4.2	CHARAKTERISIERUNG SUSPENDIERTER BRACHYURY ES-ZELLEN .....	64
4.3	DYNAMISCHE SUSPENSIONSKULTUREN .....	71
4.3.1	Morphologie von Brachyury ES-Zellen in dynamischer Suspensionskultur.....	71
4.3.2	Proliferation und Sphärengroße von Brachyury ES-Zellen in dynamischer Suspensionskultur ...	77
4.3.3	Pluripotenz .....	81
4.3.4	Differenzierungspotential.....	82
4.3.5	Zusammenfassung und Diskussion der Suspensionskulturen .....	86
4.4	ANWENDUNG VON SUSPENSIONSKULTUREN AUF INDUZIERTER PLURIPOTENTE STAMMZELLEN .....	89
4.4.1	Charakterisierung suspendierter induzierter pluripotenter Stammzellen .....	89
4.4.2	Dynamische Suspensionskultur .....	93
4.4.3	Zusammenfassung und Diskussion .....	95
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK .....</b>	<b>97</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>102</b>
6.1	MATERIALIEN .....	102
6.1.1	Verbrauchsmaterial.....	102
6.1.2	Chemikalien.....	102
6.1.3	Lösungen und Puffer .....	104
6.1.4	Enzyme .....	105
6.1.5	Zytokine .....	105
6.1.6	Antikörper.....	105
6.1.7	Reaktionskits.....	105
6.1.8	Molekulargewichtsmarker.....	105
6.1.9	Chromatographiesäule, Membranadsorber und 8-Strips .....	106
6.1.10	Spinnerflaschen.....	106
6.2	GERÄTE .....	106
6.3	BAKTERIENSTÄMME .....	107
6.4	EXPRESSIONSVEKTOREN.....	108
6.5	ZELLINIEN .....	110
6.6	METHODEN .....	111
6.6.1	Arbeiten mit rekombinanten E. coli Stämmen .....	111
6.6.1.1	Medien und Zusätze.....	111
6.6.1.2	E. coli Kultivierung und Expression von rekombinanten Proteinen .....	111
6.6.1.3	Zellaufschluss von E. coli .....	112
6.6.2	Proteinaufreinigung über Vivawell 8-Strips.....	113
6.6.3	Proteinaufreinigung mittels FPLC.....	114
6.6.4	Proteinbestimmung in Lösung nach Bradford.....	117
6.6.5	Proteinbestimmung im Gel über Densitometrie .....	118
6.6.6	Proteolytische Spaltung mittels TEV-Protease.....	118

6.6.7	<i>SDS PAGE und Western Blot</i> .....	118
6.6.8	<i>Arbeiten mit Zellkulturen</i> .....	121
6.6.8.1	Medien und Zusätze .....	121
6.6.8.2	Kultivierung und Subkultivierung von PC-12 und NIH-3T3 Zellen .....	122
6.6.8.3	Kultivierung und Subkultivierung von ES-Zellen und iPS-Zellen .....	122
6.6.8.4	Revitalisierung von Zellen .....	123
6.6.8.5	Kryopräservierung von Zellen .....	123
6.6.8.6	Bestimmung der Zellzahl und Vitalität .....	124
6.6.8.7	Bestimmung der Verdopplungszeit $t_D$ und der spezifischen Wachstumsrate $\mu$ .....	124
6.6.9	<i>MTT Test</i> .....	125
6.6.10	<i>Differenzierung von ES- und iPS-Zellen über Embryoid Bodies</i> .....	125
6.6.10.1	Differenzierung mittels hängender Tropfen ( <i>hanging drops</i> ) .....	125
6.6.10.2	Differenzierung ausgehend von Zellsphären .....	126
6.6.10.3	Auswertung der kardialen Differenzierung .....	126
6.6.11	<i>Durchflusszytometrische Analyse der Expression von Pluripotenzmarkern</i> .....	126
6.6.12	<i>Annexin-V Assay zur Apoptosemessung mittels Durchflusszytometrie</i> .....	128
6.6.13	<i>RNA-Isolierung und RT-PCR</i> .....	129
6.6.14	<i>Fixierung und DAPI Färbung von Zellen</i> .....	131
6.7	ERGÄNZENDE ERGEBNISSE .....	132
6.7.1	<i>Bestimmung der Korrelation von Viabilität zu Zellzahl anhand von NIH-3T3 Kulturen</i> .....	132
6.7.2	<i>Ermittlung eines geeigneten Metallkations zur Aufreinigung der TEV Protease</i> .....	133
7	<b>REFERENZEN</b> .....	134



## 1 Einleitung

In den vergangenen Jahren hat das Interesse an Stammzellen unterschiedlicher Herkunft stark zugenommen, was sowohl für adulte als auch embryonale bzw. pluripotente Stammzellen der Fall ist. Der Vorteil adulter Stammzellen liegt in ihrer ethisch unbedenklichen Herkunft. Insbesondere mesenchymalen Stromazellen, erstmals 1970 von Friedenstein im Knochenmark entdeckt<sup>1</sup>, wird ein hohes Potential für den klinischen Einsatz zugeschrieben. Allerdings begrenzen bestimmte Faktoren wie eine geringe Verfügbarkeit und eine bedeutende Donor-abhängige Qualität die Anwendung dieser Zellen für reproduzierbare Prozesse. Neuartige Quellen für mesenchymale Stromazellen wie das Nabelschnur- und Fettgewebe bieten eine höchst interessante Alternative und werden derzeit zunehmend untersucht.

Die nachgewiesene Differenzierbarkeit in die mesodermale Linie, insbesondere zu osteogenen, chondrogenen sowie adipogenen Zelltypen<sup>2</sup> offenbart das große Potential von mesenchymalen Stromazellen für das *Tissue Engineering* von Knochen und Knorpel. Allerdings wird ihre Fähigkeit, zu funktionalen Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) oder zu Zelltypen des Endo- und Ektoderms zu differenzieren, in der Literatur kontrovers diskutiert<sup>3-6</sup>. Die natürlich auftretende Seneszenz adulter Stammzellen führt außerdem zu einer limitierten Proliferationskapazität. Diese Faktoren könnten den Einsatz von mesenchymalen Stromazellen für bestimmte Anwendungen einschränken, insbesondere wenn große Mengen an Zellen und spezielle Differenzierungswege benötigt werden.

Aufgrund ihres Potentials, zu allen Zelltypen des Körpers differenzieren zu können sowie des Vermögens zu unbegrenzter *in vitro* Vermehrung finden embryonale Stammzellen (ES-Zellen) ebenso breite Anwendung in den oben genannten Forschungsfeldern. Wie bei adulten Stammzellen liegt auch hier die große Herausforderung darin, diese Zellen bzw. aus ihnen hervorgegangene spezialisierte Zelltypen für zukünftige Zellersatztherapien als direkte Zellinjektion oder in Form dreidimensionaler Gewebekonstrukte einzusetzen.

ES-Zellen werden als pluripotent bezeichnet, da sie im Gegensatz zu multipotenten adulten Stammzellen ein sehr viel breiteres Spektrum an Differenzierungswegen einschlagen können. So lassen sich zum Beispiel ES-Zellen zu funktionalen Kardiomyozyten oder Insulin produzierenden  $\beta$ -Zellen differenzieren, die für spezifische Toxizitätsuntersuchungen oder in der Wirkstofffindung eingesetzt werden können. Die pharmakologische Testung von Wirkstoffen basierend auf Assays mit den dafür am besten geeigneten Zelltypen ist in diesem

Zusammenhang nicht zu letzt auf pluripotente Stammzellen angewiesen<sup>7, 8</sup>.

Einen Durchbruch in der Forschung stellt die erfolgreiche Reprogrammierung somatischer Körperzellen zu induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen) dar<sup>9, 10</sup>. Diese weisen Eigenschaften auf, die bisher nur in embryonalen Stammzellen beobachtet wurden. Im Gegensatz zu letzteren bieten iPS-Zellen die Möglichkeit, als körpereigene Stammzellen ohne das Risiko einer Abstoßungsreaktion bei Zelltherapien eingesetzt zu werden. Zwar ist die Gewinnung von somatischen Zellen zur Reprogrammierung zu iPS-Zellen ethisch unbedenklich, jedoch bergen die iPS-Zellen infolge der zu ihrer Herstellung verwendeten retroviralen Transduktionsmethoden nicht unerhebliche Risiken. Um dennoch klinische Anwendungen zu ermöglichen, werden aus diesem Grund Reprogrammierungsprotokolle optimiert, die im Idealfall einen vollständigen Verzicht auf rekombinante DNA beinhalten<sup>11, 12</sup>. Trotz aller großen Erwartungen an iPS-Zellen ist die Nutzung embryonaler Stammzellen für die Forschung weiterhin relevant. Der Bedeutsamkeit von humanen ES-Zellen für Forschungszwecke wurde nicht zuletzt Nachdruck verliehen, als am 11. April 2008 der Bundestag mehrheitlich entschieden hat, das deutsche Stammzellgesetz zu ändern. Bis dahin mussten humane embryonale Stammzelllinien vor dem 1. Januar 2002 erzeugt worden sein. Der Stichtag für den Import zugelassener Linien ist nun der 1. Mai 2007 und eröffnet die Möglichkeit, mit jüngeren und qualitativ besseren Zelllinien zu arbeiten.

Weitere Voraussetzungen, um Stammzellen für die regenerative Medizin oder das Tissue Engineering einsetzen zu können, sind standardisierte und kontrollierbare Herstellungsverfahren, um die Verfügbarkeit großer Mengen von Stammzellen in hoher Qualität sicherzustellen. Es wird geschätzt, dass  $1-2 \cdot 10^9$  Stammzellen zur Behandlung eines Patienten nach Myokardinfarkt<sup>13</sup> oder als Ersatz von Insulin produzierenden Beta-Zellen bei Diabetes Typ 1 Patienten erforderlich sein würden<sup>14</sup>. Die Entwicklung und Durchführung von Prozessen für die Produktion von Stammzellen im klinischen bzw. industriellen Maßstab beinhaltet ferner eine Berücksichtigung des Mediumbedarfs. Durch die Supplementierung des Kulturmediums mit biologisch aktiven Zytokinen können insbesondere bei *large scale* Prozessen nicht unerhebliche Kosten anfallen. Während Produktionsverfahren für Biopharmazeutika mittels CHO- oder Hybridomzellen in der Größenordnung von mehreren tausend Litern bereits etabliert sind, liegt der Maßstab von Prozessoptimierungsexperimenten zur Generierung und Differenzierung von Stammzellen bisher im Bereich von 0,1-50 ml<sup>13</sup>. Größere Volumina von mehr als 1L stellen immer noch eine Ausnahme dar<sup>15, 16</sup>.

### Aufgabenstellung:

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung technologischer Verfahren, um eine Durchführung skalierbarer Produktionsprozesse für die Expansion embryonaler Stammzellen zu ermöglichen. In diesem Zusammenhang soll auf zwei wesentliche Aspekte der Stammzellkultivierung eingegangen werden:

- die Bereitstellung von Zytokinen, die als essentielle Kulturmedienbestandteile erforderlich sind sowie
- die Untersuchung unterschiedlicher Kultivierungssysteme im Hinblick auf ihre Einsetzbarkeit für eine effiziente Expansion embryonaler Stammzellen.

Im Rahmen der Arbeit sollen zunächst mittels rekombinanter *Escherichia coli* Stämme Produktions- und Aufreinigungsprozesse für die Zytokine *basic Fibroblast Growth Factor* sowie *Leukemia Inhibitory Factor* entwickelt und durchgeführt werden. Dabei sollen besonders die bei der heterologen Expression humaner Proteine auftretenden Schwierigkeiten identifiziert und soweit wie möglich beseitigt werden. Um weiterhin den Einsatz dieser Wachstumsfaktoren für Stammzellkulturen zu ermöglichen, sollen zellbasierte Assays zur Überprüfung der biologischen Aktivität der aufgereinigten Proteine entwickelt und umgesetzt werden.

Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit in der Untersuchung verschiedener Kultivierungssysteme für ES-Zellen. Zunächst soll eine murine Modell-ES-Zelllinie von adhärentem und Feederzell-abhängigem Wachstum an Suspensionsbedingungen adaptiert werden. Mit diesem Ansatz soll die Grundlage für verschiedene Suspensionskulturen geschaffen werden, die für ein *scale up* des Kultivierungsmaßstabs viel besser zugänglich sind als adhärente Kulturen. Diverse Suspensionskultivierungssysteme sollen daraufhin nach verschiedenen Kriterien beurteilt werden. So soll neben der Zellmorphologie das Proliferations- sowie Differenzierungspotential der generierten ES-Zellen untersucht werden. Damit einhergehend sollen Pluripotenz- bzw. Differenzierungsmarker auf transkriptionaler sowie auf Protein- und funktionaler Ebene nachgewiesen werden.

Abschließend soll untersucht werden, in wie fern sich die für ES-Zellen etablierten Suspensionsbedingungen auf murine iPS-Zellen übertragen lassen.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Stammzellen

Stammzellen besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung sowie das Vermögen, in spezialisierte Zelltypen differenzieren zu können. So wird zwischen totipotenten, pluripotenten und multipotenten Stammzellen unterschieden. Aus totipotenten Stammzellen kann sich unter geeigneten Bedingungen ein vollständiger Organismus entwickeln. Dies ist bei Blastomeren nur bis zum 8-Zell-Stadium der Fall. Bis zu diesem Zeitpunkt wird das Trophoektoderm aus den Stammzellen gebildet, ohne dass die Entwicklung zu einem Organismus nicht möglich ist. Nach dem 8-Zell-Stadium sind die Zellen nur noch pluripotent, d.h. sie können sich zu allen Zelltypen des Organismus entwickeln, aus ihnen kann aber kein vollständiger Organismus mehr entstehen<sup>17</sup>. Bei multipotenten Stammzellen handelt es sich um solche, aus denen nur noch bestimmte, aber nicht mehr alle Zelltypen hervorgehen können.

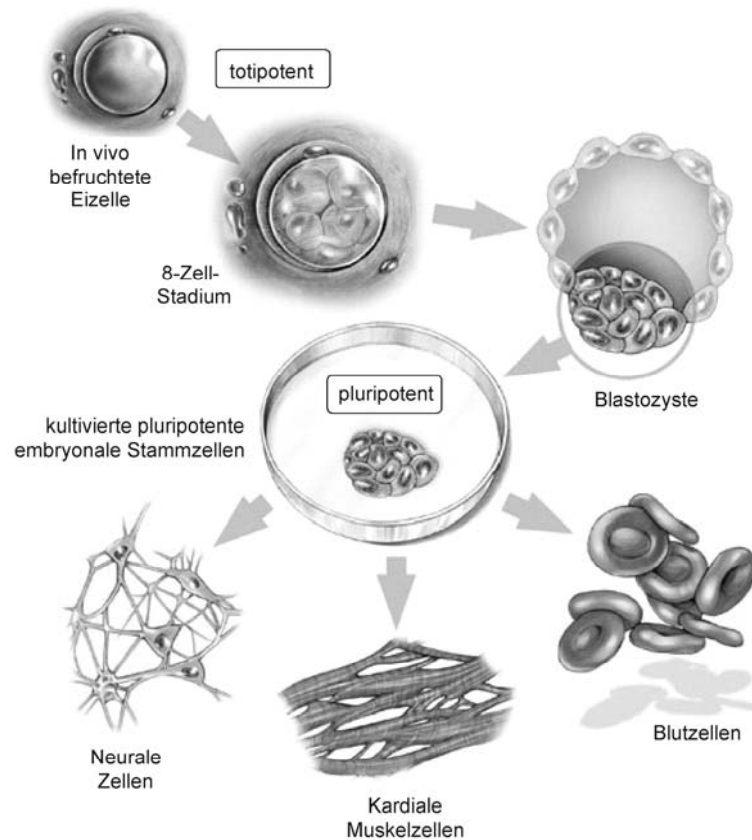
Adulte Stammzellen sind multipotent und werden definiert als gewebespezifische Stammzellen des postembryonalen Stadiums, die nur zu Zelltypen des Herkunftsgewebes differenzieren können<sup>5, 6</sup>. Ergebnisse zahlreicher Publikationen der letzten Jahre erweitern jedoch das bisher angenommene Entwicklungspotential adulter Stammzellen<sup>18-20</sup>. In diesem Kontext wird eine mögliche „Stammzellplastizität“ diskutiert. Sie wird definiert als die Eigenschaft einer Einzelzelle, sich selbst zu erneuern, zu Zelltypen ihrer Gewebeherkunft sowie zu Zelltypen eines fremden Gewebes zu differenzieren und diese beiden Gewebe *in vivo* stabil besiedeln zu können<sup>6</sup>. Sowohl dieses Phänomen, als auch der berichtete pluripotente Charakter von Stammzellen aus dem plazentalen Nabelschnurblut<sup>21</sup> werden derzeit kontrovers diskutiert, wobei zukünftige Studien zeigen müssen, in wie fern diese Befunde aussagekräftig und reproduzierbar sind<sup>5, 22</sup>.

#### 2.1.1 *Embryonale Stammzellen*

ES-Zellen wurden zum ersten Mal 1981 von Evans *et al.* und Martin *et al.* aus der inneren Zellmasse von Mäuse-Blastozysten gewonnen<sup>23, 24</sup>. 1998 gelang es Thomson *et al.* erstmals, humane ES-Zellen zu isolieren<sup>25</sup>. ES-Zellen können *in vitro* unbegrenzt im pluripotenten Stadium kultiviert werden und haben die Fähigkeit, zu allen Zelltypen zu differenzieren, die aus den drei Keimblättern Endo-, Meso- und Ektoderm entstehen<sup>26</sup>.



Abbildung 2.1 zeigt eine Übersicht zur Isolierung und Kultivierung embryonaler Stammzellen.



**Abbildung 2.1** Isolierung und Kultivierung pluripotenter embryonaler Stammzellen. Nach Isolierung der inneren Zellmasse aus einer Blastozyste werden durch mehrfache Subkultivierung embryonale Stammzellen gewonnen. Diese können zu allen Zelltypen des Organismus differenzieren. Adaptiert aus <sup>27</sup>.

Die Beurteilung bzw. Charakterisierung des pluripotenten, undifferenzierten bzw. differenzierten Zustands von ES-Zellen beruht auf der Expression bestimmter Markerproteine. Diese werden in Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tabelle 1** Markerexpression von undifferenzierten (pluripotenten) und differenzierten ES-Zellen. Aus Stem Cell Markers<sup>28</sup>, weitere Literaturangaben in der Tabelle.

Marker	Undifferenzierter Zustand (Pluripotenz)	Differenzierter Zustand
<i>Octamer binding transcription factor-3/4</i> (Oct-3/4)	Transkriptionsfaktor, wird spezifisch in toti- und pluripotenten Zellen exprimiert	
Nanog	Homeobox Transkriptionsfaktor; blockiert BMP-induzierte medodermale Differenzierung <sup>29</sup>	
Rex-1/ Zfp-42	Trankriptionsfaktor, wird von Oct-3/4 und Nanog reguliert <sup>30, 31</sup>	
<i>Stage Specific Embryonic Antigen</i> (SSEA-1/ SSEA-3,4)*	Während der frühen Embryonalentwicklung spezifisch exprimiertes Oberflächenprotein	
Alpha-Fetoprotein (AFP)		exprimiert in Zellen des primitiven <i>Endoderms</i>
Nestin, Vimentin		exprimiert in neuralen und pankreatischen Vorläuferzellen ( <i>Ektoderm</i> )
<i>Brachyury</i> (Bry, T)		Transkriptionsfaktor exprimiert während der frühen <i>mesendodermalen</i> Entwicklung
<i>Bone morphogenetic protein-4</i> (BMP-4)		Spezifisch exprimierter Wachstumsfaktor während der frühen <i>Mesoderm</i> -Bildung
Myogenin		Transkriptionsfaktoren, regulieren die Differenzierung von Muskelstammzellen zu <i>Myoblasten</i>
<i>Myosin heavy chain</i> (MHC)		Proteinkomponente des kontraktile <i>Herzmuskelapparates</i>

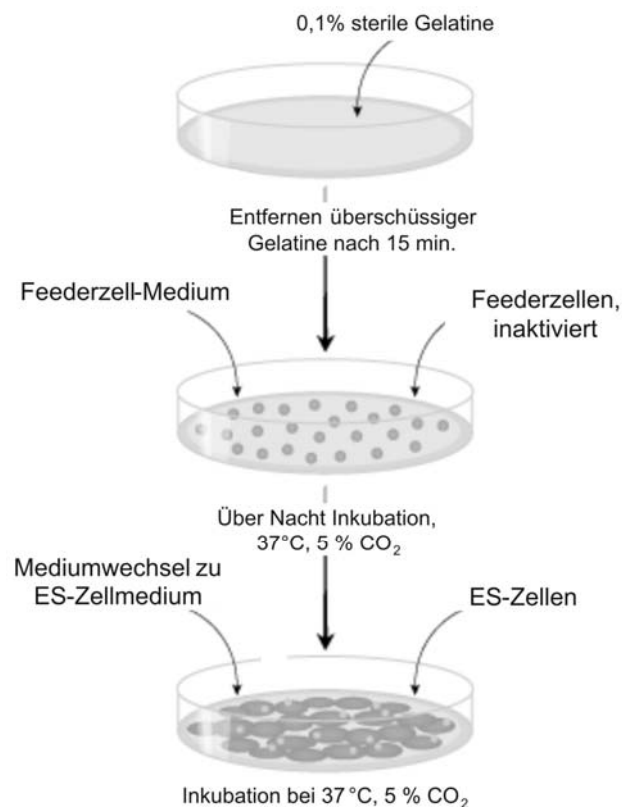
\* SSEA-1: exprimiert in murinen ES-Zellen; SSEA-3,4: exprimiert in humanen ES-Zellen

Allein der Expressionsnachweis bestimmter Markergene bzw. ihrer Produkte reicht im Allgemeinen jedoch nicht aus, um einen Zelltyp zu beschreiben bzw. zu definieren. Beispielsweise gibt die Morphologie, insbesondere der undifferenzierten Zellen, einen Rückschluss über den pluripotenten Zustand. Ferner vervollständigen funktionale Nachweise von Enzymaktivitäten (z.B. bestimmte Subtypen von alkalischer Phosphatase bei undifferenzierten ES-Zellen<sup>32</sup>) oder die Sekretion zellspezifischer Moleküle wie z.B. Insulin bei pankreatischen  $\beta$ -Zellen<sup>33</sup> die Zellcharakterisierung.

### 2.1.1.1 Zellkulturtechniken für embryonale Stammzellen

Die *in vitro* Vermehrung embryonaler Stammzellen ist technisch anspruchsvoll, da die Zellen eine starke Tendenz zur spontanen Differenzierung aufweisen. Der undifferenzierte und somit pluripotente Zustand der Zellen muss deshalb von Außen unterstützt werden. Ein

bewährter Ansatz hierfür ist eine Ko-Kultur von ES-Zellen mit so genannten Feederzellen. Die Bildung von extrazellulärer Matrix sowie die Sekretion zahlreicher biologisch aktiver Faktoren ins Kulturmedium werden bei Feederzellen als wichtige Eigenschaften ausgenutzt, um den undifferenzierten Phänotyp von ES-Zellen zu erhalten<sup>34</sup>. Feederzellen sind primäre Fibroblasten und werden in der Regel aus 13 bis 14 Tage alten Mäuseembryonen isoliert. Der Einsatz von humanen primären Fibroblasten aus dem neonatalen Vorhautgewebe ist ebenso möglich<sup>35, 36</sup>. Bei Ko-Kulturen von ES-Zellen mit Feederzellen müssen die Feederzellen mitotisch inaktiviert werden, um eine alleinige Proliferation der ES-Zellen zu gewährleisten. In der Regel werden die Feederzellen hierzu mit Gamma-Strahlung oder chemisch behandelt, zum Beispiel mit Mitomycin C, bevor sie für eine Ko-Kultur eingesetzt werden. Eine Beschichtung der Kulturschale mit Gelatinelösung wird häufig zur Unterstützung der Zelladhärenz durchgeführt. Abbildung 2.2 zeigt die Vorhergehensweise bei einer beispielhaften Ko-Kultur.

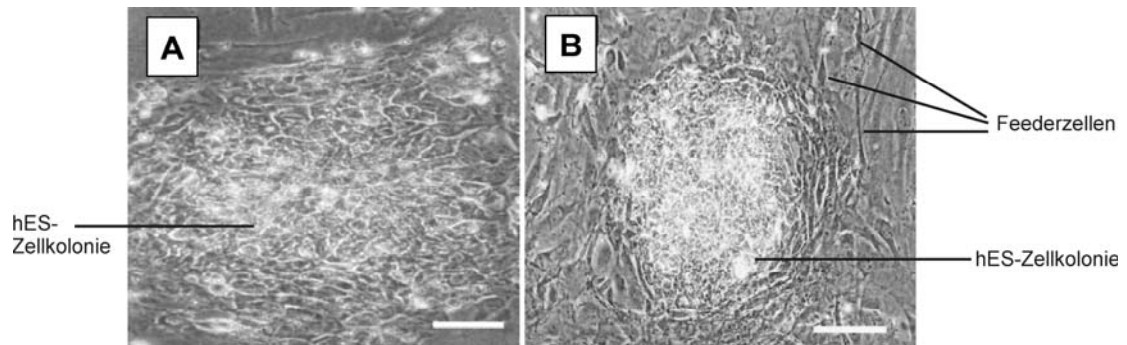


**Abbildung 2.2** Beispielhafte Darstellung einer Ko-Kultur-Präparation von ES-Zellen mit Feederzellen. Adaptiert aus <sup>37</sup>.

Allerdings sind Ko-Kulturen sehr zeit- und arbeitsaufwendig und stellen ferner ein mögliches Kontaminationsrisiko z.B. durch Mykoplasmen dar. Im Hinblick auf mögliche klinische Anwendungen ist eine Kultur von ES-Zellen unter chemisch definierten und xeno-freien Bedingungen allerdings von großer Bedeutung<sup>38,39</sup>.

Seit der Identifizierung von LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) als entscheidendem Faktor für die Pluripotenz und Selbsterneuerung muriner ES-Zellen<sup>40</sup> kann auf Feederzellen bei murinen ES-Zellkulturen verzichtet werden<sup>41</sup>. Weiterführende Arbeiten haben gezeigt, dass eine Kombination aus LIF und dem Wachstumsfaktor BMP-4 (*Bone Morphogenic Protein-4*) den Verzicht auf fötales Kälberserum bei Kulturen undifferenzierter Maus ES-Zellen erlaubt<sup>42</sup>. Hier ist nennenswert, dass BMP-4 in Abwesenheit von LIF eine mesodermale Differenzierung einleitet.

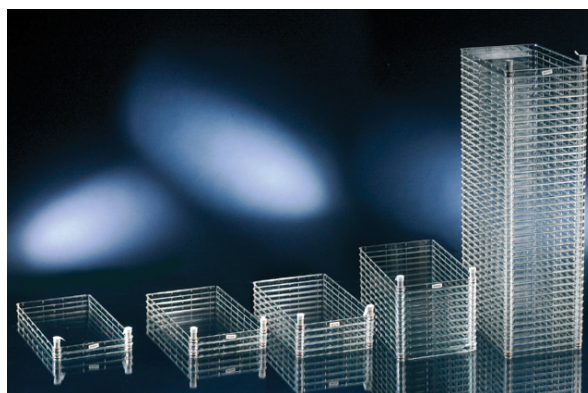
Bedingungen für die *in vitro* Kultur undifferenzierter humaner ES-Zellen werden in der Literatur vielfältig beschrieben. Erste Feederzell-freie Kulturen wurden im Jahr 2001 publiziert, wobei die Oberflächen der Zellkulturschalen mit Proteinen der extrazellulären Matrix wie Laminin und Matrigel<sup>TM</sup> (einer Kombination aus Laminin, Kollagen IV, and Heparansulfat) beschichtet wurden<sup>43</sup>. Diese Kulturen haben allerdings nur dann zu einem undifferenzierten Phänotyp von hES-Zellen geführt, wenn ein von Feederzellen konditioniertes Medium verwendet wurde. Seit 2004 ist bekannt, dass das Zytokin LIF die Pluripotenz humaner ES-Zellen über die Aktivierung des JAK/STAT3 Signalwegs nicht reguliert<sup>44</sup>, wie es für murine ES-Zellen der Fall ist. Stattdessen werden Zytokine wie TGF- $\beta$ , (*Transforming Growth Factor*- $\beta$ ) und FGF-2 (*basic Fibroblast Growth Factor*) in Kombination mit verschiedenen Vitronektin-<sup>38</sup> oder Fibronektin-<sup>45, 46</sup> Oberflächenbeschichtungen zum Erhalt des undifferenzierten Stadiums beschrieben. In diesen Fällen konnte sogar auf Serum verzichtet werden. LIF wird aufgrund seiner proliferationsfördernden Wirkung jedoch ebenso für die Kultur undifferenzierter humaner ES-Zellen eingesetzt<sup>38, 45</sup>. Abbildung 2.3 zeigt die Morphologie von undifferenzierten humanen ES-Zellen in Feederzell-freier (A) und Feederzell-haltiger (B) Kultur. In der Zellkulturschale werden stets *Kolonien* von ES-Zellen beobachtet, eine besondere Eigenschaft von ES-Zellen. Diese können nie als Einzelzellen, sondern nur in direktem Kontakt mit weiteren Zellen proliferieren. Dies gilt sowohl für murine als auch humane ES-Zellen in Feederzell-freier und Feederzell-haltiger Kultur. ES-Zellen können zwar als Einzelzellsuspension<sup>47</sup> ausgesät werden, bilden dann aber im Verlauf der Passage Kolonien wie in Abbildung 2.3 zu sehen.



**Abbildung 2.3** Lichtmikroskopische Aufnahmen humaner ES-Zellen. A: Dargestellt ist eine humane ES-Zellkolonie in serum- und Feederzell-freier Kultur auf einer Fibronectinbeschichtung. B: Die gleiche Zelllinie in serumfreier Feederzellen Ko-Kultur. Messbalken: 50  $\mu\text{m}$ . Modifiziert aus Amit, 2004<sup>26</sup>.

Die oben aufgeführten speziellen Kultivierungsbedingungen haben eine weitere bedeutende Gemeinsamkeit: sie führen zu adhärentem Wachstum der ES-Zellkolonien. Die Beschichtung der Zellkulturoberflächen mit Proteinen der extrazellulären Matrix wie Vitronectin, Fibronectin oder Laminin fördert dabei die Adhärenz der Zellen.

Im Hinblick auf die Generierung von ES-Zellen im großen Maßstab sind adhärente Kulturen allerdings unvorteilhaft. Zwar gibt es Möglichkeiten, adhärente Zellen im großen Maßstab auf mehreren übereinander liegenden Ebenen zur Oberflächenerweiterung anzuzüchten. Hier werden so genannte *Cell Factories*, erhältlich von diversen Herstellern, mit bis zu 40 übereinander liegenden Ebenen und einer Gesamtfläche von mehreren tausend  $\text{cm}^2$  eingesetzt. Jedoch ist die Handhabbarkeit dieser Systeme stark beeinträchtigt, vor allem ist eine Überwachung der Kulturen nur eingeschränkt möglich. Bestenfalls können die Zellen lediglich in den äußeren Ebenen morphologisch beobachtet werden.



**Abbildung 2.4** *Cell Factories* Nunclon™ des Herstellers Nunc. Die Systeme sind erhältlich mit bis zu 40 Ebenen, die eine Gesamtfläche von 25280  $\text{cm}^2$  ausmachen. Das Arbeitsvolumen für das 40-Ebenensystem beträgt 8 Liter. Quelle: <http://www.nuncbrand.com><sup>48</sup>

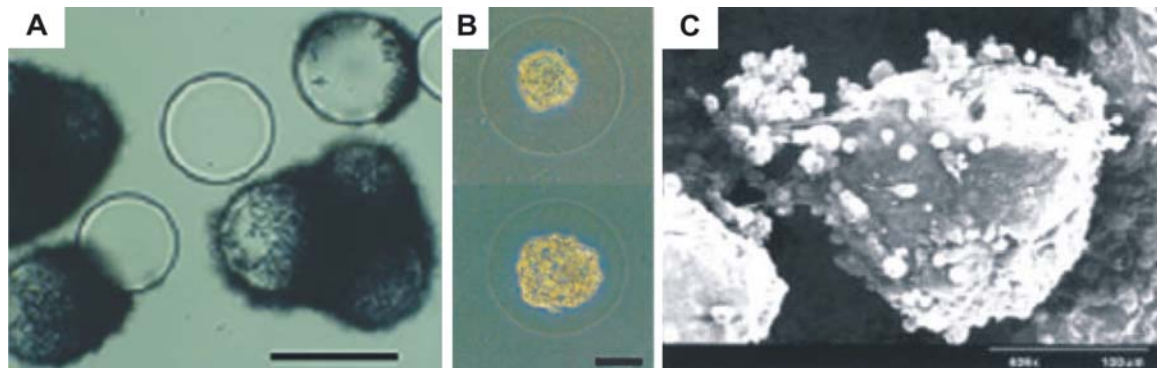
Die statische Natur und somit ausschließlich diffusionsabhängige Verteilung von Substrat- und Nährstoffen beschränkt dieses System weiterhin. Suspensionssysteme dagegen bieten homogene Zell- und Substratverteilung sowie die Möglichkeit der Überwachung und Kontrolle der Kultur.

### **2.1.2      *Suspensionskulturen embryonaler Stammzellen***

Seit Feederzell-freie Kultivierungsbedingungen für ES-Zellen bekannt sind, wurden Suspensionskulturen für diese Zellen möglich. Suspensionskulturen basieren auf dem Phänomen der spontanen Aggregation von ES-Zellen, wenn diese in Abwesenheit eines Adhärenz-fördernden Substrats kultiviert werden<sup>49, 50</sup>. Anstelle der zweidimensionalen, adhärennten Kolonien bilden sich dann suspendierte dreidimensionale ES-Zellsphären oder Zellaggregate aus.

Arbeiten der letzten Jahre auf diesem Gebiet befassen sich mit der Entwicklung von Suspensionskulturen mit dem Ziel, die Bildung der Zellsphären zu optimieren. Darüber hinaus wird untersucht, wie die Proliferation bzw. Differenzierung der Zellen effizient und skalierbar gestaltet werden kann. Tabelle 2 gibt eine Übersicht ausgewählter Publikationen der vergangenen sieben Jahre wider, in denen Kultivierungen von undifferenzierten sowie differenzierenden ES-Zellen (so genannten *Embryoid Bodies*, siehe auch Abschnitt 2.1.3) in Bioreaktoren beschrieben werden.

Eine gewisse Sonderstellung nehmen *Microcarrier*-basierte Kultivierungen ein. Hier werden ES-Zellen adhärennt auf Trägeroberflächen kultiviert, wobei die Carrier ihrerseits suspendiert in gerührten Spinnerflaschensystemen vorliegen<sup>50-52</sup>. Über den Einschluss von ES-Zellen in Alginat- und Agarosehydrogel-Kapseln<sup>53, 54</sup>, sowie die Immobilisierung auf porösen Matrices<sup>55</sup>, die ebenfalls suspendiert in Spinnerflaschen kultiviert werden, wurde weiterhin berichtet (siehe dazu Abbildung 2.5). Reine Suspensionssysteme ohne den Einsatz jeglicher Trägermaterialien sind allerdings für skalierbare Prozesse zu bevorzugen. Insbesondere die Expansion von undifferenzierten ES-Zellen ist hierbei eine schwierige Aufgabe.



**Abbildung 2.5** Verschiedene Möglichkeiten der Kultivierung von ES-Zellen. A: auf *Micorcarrier*-Oberflächen (aus Abranches *et al.*, 2007<sup>51</sup>), eingeschlossen in Agarose-Hydrogel-Kapseln (aus Bauwens *et al.*, 2003<sup>53</sup>) sowie innerhalb von porösen 3D-Matrices (rasterelektronenmikroskopische Aufnahme aus Liu *et al.*, 2005<sup>55</sup>). Messbalken in A: 200  $\mu\text{m}$ , in B: 70  $\mu\text{m}$ , in C: 150  $\mu\text{m}$ .

Erste Suspensionskulturen für undifferenzierte murine ES-Zellen in Spinnerflaschen wurden ab 2005 beschrieben<sup>50, 56, 57</sup>. Aufgrund der sehr viel komplexeren Kultivierungsbedingungen war es erst 2008 möglich, suspendierte humane ES-Zellen unter Erhalt ihrer Pluripotenz zu vermehren. Amit *et al.* waren die Vorreiter auf diesem Gebiet und patentierten ein Kultivierungsmedium für die Isolierung und Expansion undifferenzierter humaner ES-Zellen unter suspendierten Bedingungen<sup>58</sup>. Neben *Serum Replacement* (Invitrogen) enthält das Medium FGF-2 und einen Komplex aus Interleukin 6 und seinem löslichen Rezeptor („IL6-IL6R-Chimäre“). Gegenwärtig werden maximale Arbeitsvolumina von 100 ml für Kulturen undifferenzierter humaner ES-Zellen in Spinnerflaschen beschrieben. Die Autoren verwenden hierbei ebenfalls ein spezielles Expansionsmedium und -protokoll, das neben den Zytokinen FGF-2 und TGF- $\beta$  die Kombination aus einem ROCK-Inhibitor Molekül und Rapamycin beinhaltet<sup>59</sup>. Dabei wurde beobachtet, dass der ROCK-Inhibitor (*inhibitor of Rho-associated kinase*) die Überlebensrate vereinzelter, dissoziierter hES-Zellen deutlich erhöht<sup>60, 61</sup>, während die Funktion von Rapamycin, einem Stoff aus der Klasse der Makrolid-Antibiotika, noch nicht vollständig geklärt ist. Es wird vermutet, dass Rapamycin die spontane Differenzierung von hES-Zellen zu Fibroblasten verhindert und dadurch den Zusammenhalt von ES-Zellen innerhalb der Sphären stabilisiert<sup>59</sup>.

Die biologisch zwingend notwendige Aggregation von Einzelzellen zu Zellsphären stellt für die Entwicklung und Durchführung von Langzeitkultivierungen undifferenzierter ES-Zellen die größte Hürde dar.

## 2 Theoretische Grundlagen

**Tabelle 2** Publikationsübersicht zu Suspensionskulturen von ES-Zellen.

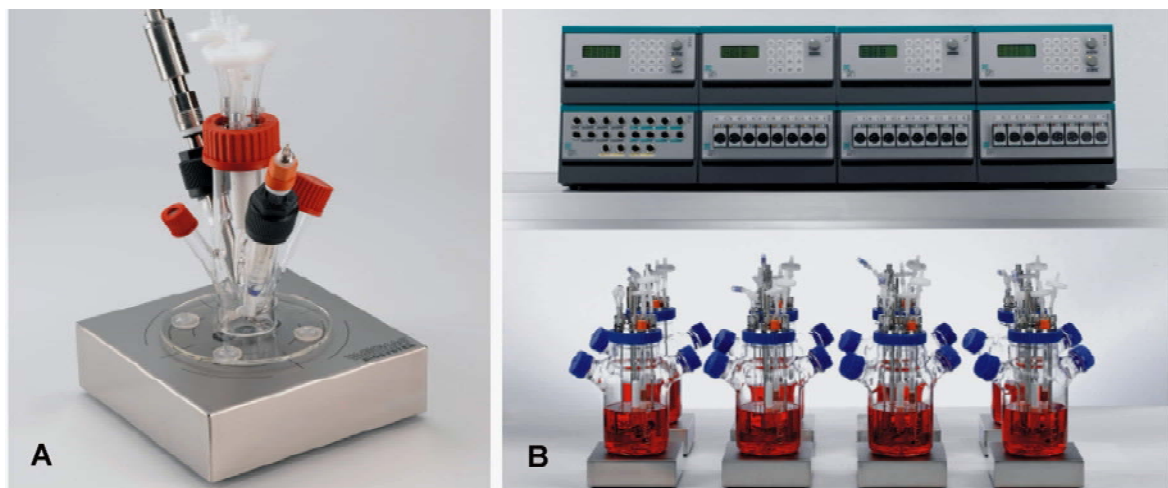
Titel der Publikation	Kultivierungsmethode	Träger/Einschluss	Reaktortyp	Arbeitsvolumen	Ref., Jahr
Scalable production of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes	Susp. von mEB	-	Spinner flask (Bellco)	250 ml	<sup>49</sup> , 2003
Bioreactor cultivation enhances the efficiency of human Embryoid Body (hEB) formation and differentiation	Susp. von hEB	-	STLV, HARV, Synthecon, Cellon S.A.	10-55 ml	<sup>62</sup> , 2004
Differentiation and Lineage Selection of Mouse ESC in a stirred Bench scale Bioreactor with Automated Process Control	Susp. von mEB	-	Biostat MD (Sartorius BBI Systems)	2 L	<sup>15</sup> , 2005
Shear-Controlled Single- Step Mouse Embryonic Stem Cell Expansion and Embryoid Body-based Differentiation	Susp. von mESC-Sphären und mESC auf MC	Cytodex-3 und Glas-Microcarrier	Spinner flask (Bellco Glass)	50 ml	<sup>50</sup> , 2005
Biomimetic Three-Dimensional Cultures Significantly Increase differentiation Efficacy of Embryonic Stem Cells	mEB auf poröser 3D-Matrix	Cytomatrix™ (Tantal-basiert)	SW Spinner System (Cytomatrix™)	keine Angabe	<sup>55</sup> , 2005
Development of a Perfusion Fed Bioreactor for Embryonic Stem Cell- derived Cardiomyocyte Generation: Oxygen-Mediated Enhancement of Cardiomyocyte output	Susp. von mEB in Mikro-kapseln	Agarose Hydrogel Microcapsules	Cellferm-Pro (DASGIP)	250 ml	<sup>53</sup> , 2005
Expansion of Undifferentiated Murine Embryonic Stem Cells as Aggregates in Suspension Culture Bioreactors	Susp. von mESC-Sphären	-	Spinner flasks Bioreactors (NDS Technologies)	100 ml	<sup>56</sup> , 2006
Expansion of mouse Embryonic Stem Cells on Microcarriers	Susp. von mESC auf MC	Cytodex-3	Spinner flask (Bellco Glass)	80 ml	<sup>51</sup> , 2007
Embryonic Stem Cells remain highly pluripotent following long term expansion as aggregates in suspension bioreactors	Susp. von mESC-Sphären	-	Spinner flask (NTS Technologies)	100 ml	<sup>57</sup> , 2007
Methods of expanding Embryonic Stem Cells in a suspension culture (Patent)	Susp. von hESC-Sphären und hEB	-	Petrischale, Erlenmeyerkolben	keine Angabe	<sup>58</sup> , 2008
Cardiomyocyte production in mass suspension culture: embryonic stem cells as a source for great amounts of functional cardiomyocytes	Susp. von mEB	-	Biostat MD (Sartorius BBI Systems)	2 L	<sup>16</sup> , 2008
Improvement of Culture Conditions of Human Embryoid Bodies Using a Controlled Perfused and Dialyzed Bioreactor System	Susp. von hEB	-	Perfundierter und dialysierter STLV	55 ml	<sup>63</sup> , 2008
Large-Scale Expansion of Pluripotent Human Embryonic Stem Cells in Stirred Suspension Bioreactors	Susp. von hESC-Sphären	-	Spinner flask (NDS Technologies)	100 ml	<sup>59</sup> , 2009
Generation of human embryonic stem cell-derived mesoderm and cardiac cells using size-specified aggregates in an oxygen-controlled bioreactor	Susp. von hEB	-	Roller Bottle (Barnstead rotisserie system), Cellferm-Pro (DASGIP)	50-150 ml	<sup>64</sup> , 2009

Abkürzungen: Susp., Suspensionskultur; hEB, human Embryoid Bodies; STLV, *Slow Turning Lateral vessel*, HARV, *High Aspect Rotating Vessel*; MC, *Microcarrier*; mEB, *murine Embryoid Bodies*; mESC, *murine Embryonic Stem Cells*, (mES-Zellen); hESC, *human Embryonic Stem Cells*, (hES-Zellen)



So liegt der Kultivierungsmaßstab von Bioprozessen zur Generierung undifferenzierter embryonaler Stammzellen gegenwärtig noch im Bereich von 100 ml.

Derzeit sind Bioreaktoren kommerziell erhältlich, die Kultivierungen im kleinen Maßstab zur Prozessoptimierung ermöglichen. Die Firma DASGIP stellt den kleinsten kontrollierbaren Bioreaktor her, der speziell für Stammzellkultivierungen entwickelt wurde (siehe Abbildung 2.6 A). Der Reaktor enthält Sensoren zur pH-, Sauerstoff- und Temperaturkontrolle und kann bei unterschiedlichen Rührgeschwindigkeiten betrieben werden. Ein weiterer Trend liegt in parallelisierten Bioreaktorsystemen, die eine simultane Durchführung von 4 bis 16 Kultivierungen im Labormaßstab ermöglichen (Abbildung 2.6 B).

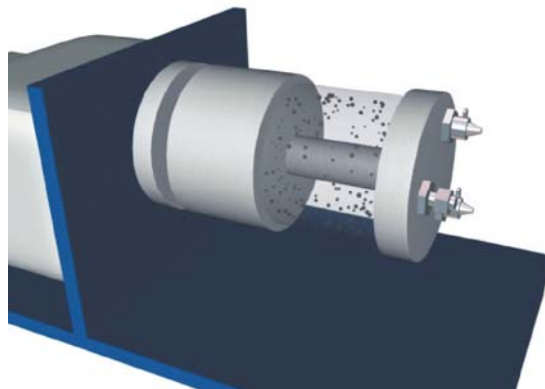


**Abbildung 2.6** A) DASGIP *Mini Spinner* für Arbeitsvolumina von 30-60 ml und B) Cellferm-Pro *Parallel Bioreactor System* für 4-16 parallel gesteuerte Bioreaktoren. Hier sind Arbeitsvolumina von je 60-200 ml bis 400-1600 ml möglich. Quelle: [http://www.dasgip.com/catalog/CC\\_RD/](http://www.dasgip.com/catalog/CC_RD/) <sup>50</sup>.

Kultivierungen von ES-Zellen unter differenzierenden Bedingungen (siehe Abschnitt 2.1.3) führen in der Regel zur Bildung von *Embryoid Bodies* (EBs). Differenzierungskulturen sind viel weniger anspruchsvoll als Kulturen, die unter Erhalt der Pluripotenz und somit zur Expansion von ES-Zellen führen (wie in Abschnitt 2.1.1.1 erläutert).

Dynamische Suspensionskulturen für EBs sind dementsprechend viel weiter entwickelt. So wurden bisher zwei kontrollierte Bioreaktorkultivierungen im *Fed-Batch* bzw. Perfusionsmodus beschrieben, die zur effizienten Generierung von murinen ES-Zell abgeleiteten funktionalen Kardiomyocyten führten<sup>15, 16</sup>. Der Kultivierungsmaßstab lag hier bei 2 Litern, was die ansonsten üblichen Arbeitsvolumina von mehreren Millilitern deutlich übertrifft.

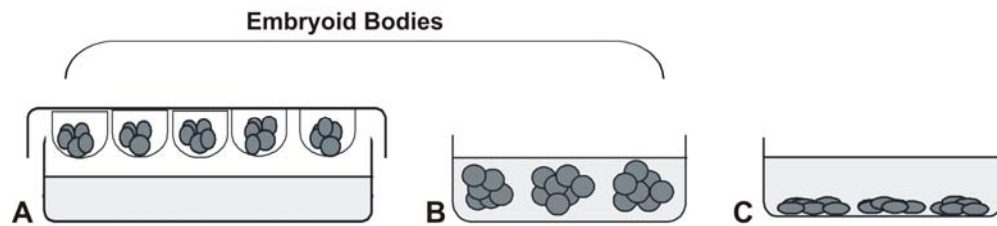
Zu erwähnen sei an dieser Stelle noch ein weiterer Reaktor, der STLV (*Slow Turning Lateral Vessel*). Hier wurde die Bildung und Differenzierung humaner EBs unter dem Einfluss der Mikrogravitation untersucht<sup>62, 63</sup>. Die Besonderheit an diesem Kulturgefäß ist die Tatsache, dass eine dynamische Suspensionskultur nicht über ein internes Rührwerk erfolgt, sondern dass der gesamte Reaktor aufgrund einer lateralen Drehung in Bewegung versetzt wird, wodurch die suspendierten Zellen einer Art von Schwerelosigkeit ausgesetzt werden (siehe Abbildung 2.7) Der Reaktorraum ist vollständig mit Kulturmedium gefüllt und stellt ein System ohne Gas-Flüssig-Übergang dar. Der Bioreaktor wurde ursprünglich von der NASA entwickelt.



**Abbildung 2.7** Schematische Darstellung des *Slow Turning Lateral Vessel*. Der Reaktorraum ist vollständig mit Kulturmedium gefüllt (55 ml). Aus Gerecht-Nir et al., 2004<sup>62</sup>.

### 2.1.3 Differenzierung von embryonalen Stammzellen

Werden *in vitro* die Bedingungen (Feederzellen, entsprechende Zytokine, siehe Abschnitt 2.1.1.1) für die Proliferation im undifferenzierten Zustand entfernt, tritt bei ES-Zellen spontane Differenzierung ein. Die Zellpopulation differenziert dann in eine Vielzahl verschiedener Zelltypen, die aus den drei Keimblättern Ekto-, Meso- und Endoderm entstehen<sup>26</sup>. Es gibt zahlreiche Verfahren, mit denen die Differenzierung von ES-Zellen eingeleitet und durchgeführt werden kann (siehe Abbildung 2.8). Die Differenzierung über so genannte *Embryoid Bodies* (EBs) ist die am häufigsten angewendete Methode. EBs ahmen die Struktur des sich entwickelnden Embryos nach und rekapitulieren viele Übergangsstufen während seiner Differenzierung<sup>65</sup>.



**Abbildung 2.8** Methoden zur Differenzierung von ES-Zellen. A: Erzeugung von *Embryoid Bodies* über hängende Tropfen (*hanging drops*), B: Erzeugung von *Embryoid Bodies* in Suspensionskultur, C: Direktes Ausplattieren von ES-Zellen in Differenzierungsmedium unter adhärennten Bedingungen.

Bei der Herstellung von hängenden Tropfen (*hanging drops*) wird eine Einzelzellsuspension von ES-Zellen in Differenzierungsmedium hergestellt, die dann zu einzelnen Tropfen (ca. 20  $\mu$ l) mit je einigen hundert Zellen auf die Deckelunterseite einer Petrischale platziert wird (Abbildung 2.8 A). Um ein Austrocknen der Tropfen während der Kultur zu verhindern, wird der Boden der Petrischale mit Flüssigkeit (meist PBS) befüllt. Ein anderer Ansatz, der weniger arbeitsaufwendig ist, besteht im Aussäen von Einzelzellen oder bereits vorgebildeten Zellsphären in Kulturschalen in Differenzierungsmedium (Abbildung 2.8 B). Jedoch können hier Agglomerationen einzelner EBs untereinander auftreten, die zu einem verringerten Wachstum und Differenzierungspotential führen können<sup>66</sup>. Die Bildung von *Embryoid Bodies* ist häufig nur eine erste Stufe der Differenzierung. Nach einigen Tagen in suspendierter Kultur werden die EBs in (meist mit Gelatine beschichtete) Zellkulturschalen ausplattiert, woraufhin sie adhärieren und weiter differenzieren. Darüber hinaus kann eine Differenzierung auch über direktes Ausplattieren entweder von Einzelzellen oder Zellkolonien in Zellkulturschalen eingeleitet werden (Abbildung 2.8 C). Die Zellen adhärieren unter diesen Bedingungen sofort und bilden differenzierende Kolonien aus.

Neben spontaner Differenzierung zu einer Mischpopulation von Zelltypen aller Keimblätter kann eine *gerichtete* Differenzierung eingeleitet werden. Durch die Zugabe von speziellen Zytokinen, anderen Signalmolekülen oder einer Ko-Kultur mit bereits spezialisierten Zelltypen kann die Differenzierung zu einer bestimmten Linie gefördert werden. So induzieren Dexamethason,  $\beta$ -Glycerolphosphat und Ascorbinsäure die osteogene Differenzierung von murinen und humanen ES-Zellen<sup>67, 68</sup>, wie es beispielsweise auch für adulte mesenchymale Stammzellen der Fall ist<sup>2</sup>.

Die Entwicklung in die pankreatische Linie beinhaltet häufig zunächst eine spontane Differenzierung zu Vorläuferzellen, gefolgt von einer gezielten pankreatischen Induktion mittels verschiedener Moleküle wie Nicotinamid, Insulin und Laminin<sup>33, 69</sup>.

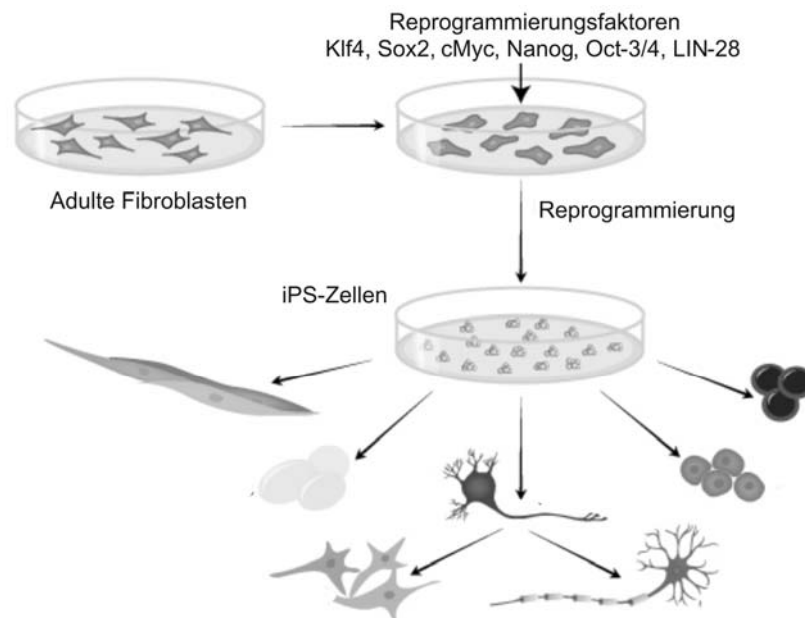
Eine gerichtete Differenzierung von ES-Zellen zu Herzmuskelzellen kann durch die Zugabe der Zytokine TGF- $\beta$ , IGF (*Insulin Growth Factor*) und FGF sowie Erythropoetin ins Differenzierungsmedium erfolgen<sup>70</sup>. Darüber hinaus sind zahlreiche weitere Arbeiten veröffentlicht, die verschiedene Protokolle für eine kardiale Differenzierung von Stammzellen beschreiben<sup>71, 72</sup>.

Eine der größten Herausforderungen stellt die gerichtete Differenzierung von embryonalen Stammzellen zu einer reinen, homogenen Population spezialisierter Zelltypen dar. Hoch reine Zellpopulationen sind für klinische Anwendungen zwingend erforderlich, da undifferenzierte Stammzellen innerhalb einer differenzierten Zellpopulation nach einer Injektion *in vivo* Tumore, so genannte Teratome bilden können<sup>73-75</sup>. Insbesondere bei embryonalen Stammzellen, die allgemein ein sehr hohes Differenzierungspotential aufweisen, besteht eine differenzierte Zellpopulation sehr häufig aus verschiedenen Zelltypen, auch wenn eine gerichtete Differenzierung in eine gewünschte Linie induziert worden ist. Gegenwärtig liegt ein Forschungsschwerpunkt deshalb in der Optimierung von Protokollen, die zu „effizienten“ Differenzierungen führen. Das Ziel liegt darin, 100 % der Zellpopulation zum gewünschten Zelltyp zu differenzieren.

### **2.1.4 Induzierte pluripotente Stammzellen**

Seit im Jahr 2006 die erste erfolgreiche Reprogrammierung muriner adulter Fibroblasten zu induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen) berichtet wurde<sup>10</sup>, sind iPS-Zellen aktueller Gegenstand in der Stammzellforschung. Seither wurden humane somatische Zellen aus den verschiedensten Quellen reprogrammiert, unter anderem aus dem Fettgewebe<sup>76</sup> und dem Nabelschnurblut<sup>77, 78</sup>. Im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen ist die Herkunft von iPS-Zellen ethisch unbedenklich und im Hinblick auf eventuelle zukünftige therapeutische Anwendungen wird bei körpereigenen iPS-Zellen keine Abstoßungsreaktion erwartet. Erbkrankheitsspezifische iPS-Zellen (d.h. Zellen, die einer kranken Person entnommen und reprogrammiert wurden) können darüber hinaus einerseits wichtige Rückschlüsse über die genetischen Ursachen der Erkrankung liefern und ferner für spezifische Medikamentenscreenings eingesetzt werden<sup>79</sup>. Jedoch sind iPS-Zellen gegenwärtig noch ungeeignet für diese Anwendungen, da die Reprogrammierung somatischer Körperzellen zu pluripotenten Stammzellen erstens noch recht ineffizient ist. Des Weiteren bergen die zu ihrer Herstellung verwendeten Methoden ein erhebliches Risiko der Tumorbildung nach

Transplantation. In den anfänglich beschriebenen Methoden war ein retroviraler Transfer der Gene Oct-3/4, Sox2, Klf4 und cMyc (die zum Erhalt der Pluripotenz in ES-Zellen von Bedeutung sind) notwendig, um die somatischen Zellen zurück in ihren pluripotenten Zustand zu versetzen.



**Abbildung 2.9** Schematische Darstellung der Reprogrammierung somatischer Körperzellen (hier Fibroblasten) zu induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen). Adaptiert aus <sup>80</sup>.

Retrovirale Vektoren können allerdings Onkogene aktivieren und somit zu Tumoren führen<sup>81</sup>, und cMyc selbst ist ein Onkogen, das nach erfolgter Reprogrammierung der Zellen später wieder reaktiviert werden könnte. Ein Forschungsschwerpunkt liegt von daher in der Optimierung der anfänglichen Reprogrammierungsprotokolle. So wurden zunächst verschiedene Kombinationen der relevanten „Reprogrammierungsfaktoren“ untersucht (siehe Abbildung 2.9). Beispielsweise konnten Nanog und LIN-28 die ursprünglich verwendeten Klf4 und cMyc-Gene ersetzen<sup>82</sup>. Ein Verzicht auf retrovirale Vektoren konnte über eine wiederholte transiente Transfektion von somatischen Zellen mit Expressionsplasmiden für Oct-3/4, Sox2, Klf4 und cMyc erreicht werden. Diese enthielten keine viralen Sequenzen und es konnte keine Integration der eingebrachten DNA ins Wirtschromosom nachgewiesen werden<sup>83</sup>. Dennoch beinhalteten diese Methoden immer noch genetisches Material und somit das Potential für genetische Modifikationen der Zielzellen. Diese können zu einer genetischen Instabilität von iPS-Zellen im Verlauf der *in vitro* Expansion führen. Während in vielen Fällen ein normaler Karyotyp von iPS-Zellen

nach erfolgter Langzeitexpansion berichtet wurde<sup>9, 11, 79, 82, 84</sup>, konnten in einer anderen Untersuchung bei 90 % der iPS-Zellen, die zusätzlich mithilfe eines SV40 *large T* Antigens reprogrammiert wurden, bereits nach zehn Passagen chromosomale Veränderungen beobachtet werden<sup>85</sup>. Der Verzicht auf jegliche rekombinante DNA für eine erfolgreiche und sichere Reprogrammierung adulter Zellen ist somit ein bedeutender Punkt. Ein weitererführender Ansatz war demnach die Protein-induzierte Reprogrammierung von Körperzellen<sup>11, 86</sup>. Dabei gelang es, die *Proteine* Oct-3/4, Sox2, Klf4 und cMyc mithilfe N-terminaler Polyargininsequenzen durch die Zellmembranen zu schleusen. Aufgrund der kurzen Überlebenszeit im Zytoplasma wurde die Behandlung mit dem Protein-Cocktail über mehrere Tage wiederholt. Wie auch bei der Methode mittels Gentransfer wurde in erfolgreich reprogrammierten Zellen eine endogene Expression der Pluripotenz assoziierten Gene beobachtet, die nun den Phänotyp der iPS-Zellen bestimmten. Diese Methode ist allerdings noch sehr ineffizient; nur durchschnittlich eine von 10<sup>5</sup> anfänglich behandelten adulten Zellen (0,001 %) konnte reprogrammiert werden (mittels retroviraler Transduktion waren es 0,01 %).

Dennoch zeigten die iPS-Zellen viele Eigenschaften, die sonst nur in embryonalen Stammzellen beobachtet werden; eine Reaktivierung der *endogenen* Oct-3/4 und Nanog-Expression nach Demethylierung des jeweiligen Genpromoters, eine Übereinstimmung weiterer Genexpressionsmuster mit denen von ES-Zellen, ES-zelltypisches aktivierendes und reprimierendes Histonmethylierungsmuster sowie volles Entwicklungspotenzial in Zelltypen aller drei Keimblätter<sup>11</sup>. Die iPS-Zellen unterliegen ebenfalls einer Abhängigkeit von FGF-2<sup>76</sup> bzw. LIF<sup>87</sup> zur undifferenzierten Proliferation und es gelten im Allgemeinen die gleichen Kultivierungsbedingungen, wie sie für ES-Zellen beschrieben wurden (vgl. Abschnitt 2.1.1.1.).

## 2.2 Zytokine in der Stammzellkultivierung

### 2.2.1 Definition und Wirkweise von Zytokinen

Zytokine sind Proteine mit regulatorischer Funktion auf die Differenzierung und das Wachstum von Zellen *in vivo* und *in vitro*. In der Stammzellkultur sind Zytokine wesentliche Bestandteile der Expansions- und Differenzierungsmedien.

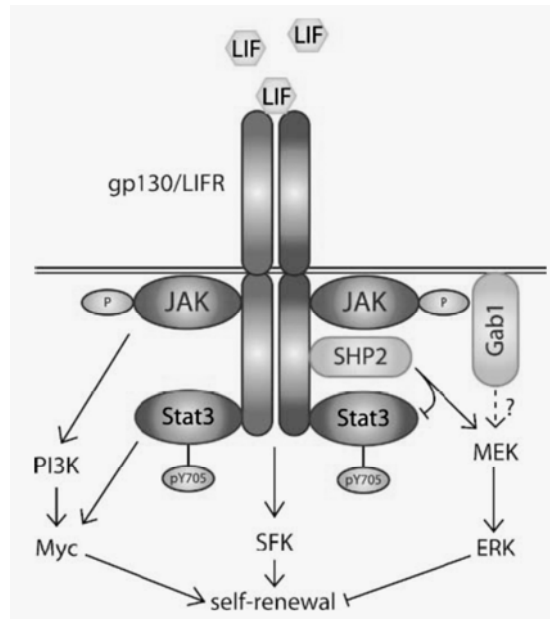
Wie in Abschnitt 2.1.1.1 erläutert, muss bei der *in vitro* Kultur von embryonalen Stammzellen das pluripotente Stadium durch die Mediensupplementierung mit *basic fibroblast growth factor* (bei humanen ES-Zellen) und *Leukemia Inhibitory Factor* (bei murinen ES-Zellen) aufrecht erhalten werden. Diese beiden Zytokine spielen also eine entscheidende Rolle bei der Expansion von ES-Zellen, indem sie ihre Proliferation und Selbsterneuerung fördern und gleichzeitig das Ausdifferenzieren inhibieren.

Detaillierte biochemische und funktionale Beschreibungen von *Fibroblast Growth Factor-2* (FGF-2) sind in der Dissertationsarbeit von Chen Ran<sup>88</sup> bzw. in den Diplomarbeiten von Wiebke Prilop<sup>89</sup> und Yangxi Zhao<sup>90</sup> zu finden und werden an dieser Stelle nicht weiter behandelt.

### Leukemia Inhibitory Factor

*Leukemia Inhibitory Factor* (LIF) ist ein pleiotropes Zytokin, das 1987 von Gearing *et al.* erstmals identifiziert wurde<sup>91</sup>. Humanes LIF (hLIF) hat eine Größe von 19,7 kDa und besteht aus 180 Aminosäuren. Darunter befinden sich sechs Cysteine, die drei Disulfidbrücken ausbilden. LIF wird als pleiotrop bezeichnet, da es eine Reihe verschiedener Funktionen auf unterschiedliche Zelltypen aufweist (siehe dazu eine Übersichtsarbeit von Hilton *et al.*<sup>92</sup>). Im Hinblick auf den Einsatz für ES-Zellkulturen wird hier auf die Funktion von LIF zur Selbsterneuerung pluripotenter muriner ES-Zellen näher eingegangen.

LIF bindet an den spezifischen, niedrig-affinen LIFR- $\beta$  (LIF Rezeptor- $\beta$ ), der daraufhin mit dem Signalweiterleitungsrezeptor gp130 (*glyco protein* 130) dimerisiert (Abbildung 2.10). Erst die Bildung dieses hoch affinen Trimer-Komplexes aus LIF, dem LIF-R  $\beta$  und gp130 führt zur Aktivierung der JAK/STAT3 und MAPK Signalwege in ES-Zellen<sup>93</sup>.



**Abbildung 2.10** Aktivierung der Signaltransduktionswege JAK/STAT-3 und MAPK durch den trimeren LIF-Rezeptorkomplex. Aktiviertes STAT-3 Protein führt über mehrere Stufen zur Selbsterneuerung (*self-renewal*) und Pluripotenz muriner ES-Zellen. Aus Kristensen *et al.*, 2005<sup>93</sup>.

STAT3 ist ein Transkriptionsfaktor und aktiviert durch Bindung an Promoter/Enhancer-Bereiche Zielgene, zu denen auch Gene zum Erhalt der Pluripotenz gehören. Eines davon ist Oct-3/4 (*Octamer binding transcription factor- 3/4*), das selbst einen Transkriptionsfaktor kodiert, der in diesem Zusammenhang oft als „Masterregulator der Pluripotenz“ bezeichnet wird<sup>94</sup>. Oct-3/4 gehört somit zu der Gruppe der wichtigsten Marker, über dessen Expression bei ES-Zellen der pluripotente Zustand definiert wird, was sowohl für humane als auch murine ES-Zellen gilt. Interessanterweise wird die Pluripotenz und Selbsterneuerung von humanen ES-Zellen im Gegensatz zu murinen ES-Zellen nicht über LIF und den JAK/STAT3 Signalweg induziert<sup>44</sup>. Darüber hinaus steht der JAK/STAT3-Signalweg mit einer Reihe weiterer Signaltransduktionswege, die von anderen Zytokinen aktiviert werden, zum Erhalt der Selbsterneuerung von murinen ES-Zellen in Verbindung<sup>93</sup>.



### 2.2.2 *Expression von Zytokinen in heterologen Systemen*

Um Zytokine für die (Stamm-) Zellkultur einzusetzen, müssen diese in ausreichender Menge und Reinheit verfügbar sein. Je nach dem, ob eine Glykosilierung des Zytokins für seine biologische Aktivität relevant oder sogar essentiell ist, kann das Protein in rekombinanten eukaryotischen oder prokaryotischen Organismen exprimiert werden. Nicht nur die eventuelle Glykosilierung, sondern besonders die Tertiärstruktur des Proteins bestimmt seine Aktivität. So können beispielsweise unter den reduzierenden Bedingungen im bakteriellen Zytoplasma keine Disulfidbrücken ausgebildet werden, welche für die Tertiärstruktur, korrekte Faltung und somit Löslichkeit des Proteins von enormer Bedeutung sind. Häufig wird beobachtet, dass die rekombinanten Zielproteine bei einer Expression in *Escherichia coli* in unlöslichen Aggregaten in Form von Einschlusskörpern (*inclusion bodies*) anfallen, da ihre Faltung nicht korrekt erfolgte.

Jedoch sind viele Strategien bekannt, die es ermöglichen trotz der teilweise physiologisch ungünstigen Bedingungen in Prokaryoten erfolgreich heterologe, insbesondere humane Proteine zu exprimieren und zu isolieren. So werden Prokaryoten wie *E. coli* wegen ihrer Robustheit, hohen Zellteilungsrate sowie geringen Kultivierungskosten häufig als Expressionsorganismen eingesetzt.

### 2.2.3 *Strategien zur Erzeugung löslichen Zielproteins*

Wenn die Zielproteine in *inclusion bodies* ausfallen, gibt es verschiedene Wege, sie in lösliche Form zu überführen. Zum einen ist es möglich, die aggregierten Proteine in den Einschlusskörper zu einer Umfaltung *in vitro* zu bringen<sup>95</sup>. Diese Herangehensweise ist allerdings zeitaufwändig und erfordert die individuelle Optimierung der Umfaltungsbedingungen für jedes Protein. Außerdem sind die Erträge niedrig und es bleibt fraglich, ob die Integrität des Proteins während des Umfaltungsprozesses gewahrt bleibt.

Ein anderer Ansatz, der häufig sowohl zeitsparender als auch kostengünstiger ist, ist die direkte Expression löslichen Proteins und kann durch Änderung der Expressionsbedingungen erreicht werden.

### **Optimierung des Kultivierungsprozesses**

Die Schaffung optimaler Kulturbedingungen, z.B. einer Aufrechterhaltung des pH-Wertes oder bedarfsabhängiger Nährstoffnachschub mittels eines *fed-batch*-Prozesses kann die Wachstumsbedingungen soweit verbessern, dass die Bildung von Einschlusskörpern

verhindert oder verringert wird. Meist geht eine lösliche Expression dann mit einer verringerten Wachstumsrate der Zellen einher<sup>96</sup>. Der Einsatz schwacher Promotoren beziehungsweise niedrige Induktionsniveaus resultieren in einer größeren Menge löslich produzierten Proteins<sup>97</sup>. Dies geschieht aufgrund der verringerten Transkriptionsrate und der daraus folgenden niedrigeren Proteinkonzentration, die eine korrekte Faltung vereinfacht. Dieser Effekt wird in ähnlicher Form durch Senkung des Bakterienmetabolismus mittels niedrigerer Kultivierungstemperatur erreicht.

### **Ko-Expression**

Die Ko-Expression molekularer Chaperone kann die Wahrscheinlichkeit erhöhen, dass das naszierende Protein in seine korrekte Faltung gebracht wird. Überexprimierte Chaperone können bei der Faltung naszierender Proteine assistieren oder die Protein-Aggregation unterbinden<sup>98</sup>. Außerdem besteht die Möglichkeit, Bindungspartner des Zielproteins zu ko-exprimieren, die exponierte hydrophobe Bereiche des Zielproteins binden und so eine Ursache für seine Aggregation eliminieren.

### **Modifizierung des Zielgens- oder Proteins**

Die Expression löslichen Zielproteins kann auch durch Veränderung seines Gens realisiert werden. Beispielsweise können über gerichtete Evolution besser lösliche Mutanten des Proteins gefunden werden. Verschiedene Ansätze zur gerichteten Evolution sind von Sørensen *et al.* beschrieben worden<sup>99</sup>.

Ein anderer Ansatz ist die Fusion des unlöslich exprimierten Zielproteins mit „Helfer-Proteinen“, welche eine Steigerung der Löslichkeit hervorrufen. Für die Expression in *E. coli* sind einige Fusionspartner bekannt, die die Löslichkeit von Proteinen erhöhen. Dazu zählen Maltose-bindendes Protein (MBP), N-utilisierende Substanz A (NusA) und Glutathion-S-Transferase (GST), die bei Fusion an das Zielprotein die Löslichkeit erheblich verbessern können<sup>100-102</sup>. Allerdings sind MBP (40 kDa), NusA (55 kDa) und GST (26 kDa) relativ große Proteine, die die entsprechende Energie und den Stoffeinsatz erfordern, um eine bestimmte Anzahl von Molekülen zu erzeugen und die zu sterischer Hinderung führen können. Ein wesentlich kleineres Fusionsprotein ist Thioredoxin, das ebenfalls die Löslichkeit erhöht.

### **Thioredoxin als Fusionspartner**

Das Protein ist mit 12 kDa relativ klein und besitzt eine sehr kompakte Tertiärstruktur, die eine robuste Faltung gewährleistet, so dass die Faltung von Thioredoxin durch die Anwesenheit heterologer Fusionsproteine wenig beeinflusst wird.

Auch die Fusionspartner von Thioredoxin bleiben in ihrer Funktion von der Fusion häufig unbeeinträchtigt. Die Bioaktivität und thermische Stabilität der Zielproteine bleibt generell erhalten, was darauf hinweist, dass sie in der Lage sind, ihre korrekte Faltung einzunehmen. Der Mechanismus, über den Thioredoxin (trx) als Fusionspartner zur Bildung von löslichem und korrekt gefaltetem Zielprotein beiträgt, ist nicht vollständig geklärt. Eine mögliche Erklärung für seine Wirkung ist die Interaktion mit dem nachfolgend exprimierten Protein, wobei trx als kovalent gebundenes Chaperon agiert<sup>103</sup>. Darüber hinaus wird angenommen, dass trx in Ko-Expression oder in Fusion mit dem Zielprotein eine Veränderung der zytoplasmatischen Umgebung hervorrufen kann bzw. dass die Oxidoreduktaseaktivität direkt auf heterologe Proteine wirkt<sup>104, 105</sup>.

Aus Fusionsproteinen kann das trx durch hydrolytische Abspaltung wieder entfernt werden, indem zwischen ihm und dem Zielprotein eine Erkennungssequenz für eine hochspezifische Protease hinein kloniert wird.

### 3 Bereitstellung von Zytokinen für die Stammzellkultivierung

Im experimentellen Teil der vorliegenden Arbeit werden folgende zwei Aspekte der Stammzellkultivierung behandelt: die Produktion von Zytokinen, die als essentielle Medienbestandteile in der Stammzellkultivierung eingesetzt werden sowie die Testung verschiedener Kultivierungsgefäße für eine effiziente Expansion embryonaler Stammzellen.

Die Kultivierung embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) ist technisch anspruchsvoll, da diese im Gegensatz zu adulten Stammzellen eine inhärente Eigenschaft besitzen, spontan auszudifferenzieren. So ist ein wesentlicher Punkt bei der Kultivierung von ES-Zellen die Zugabe von Zytokinen, die das Ausdifferenzieren verhindern. Für humane ES-Zellen gilt FGF-2 (*Fibroblast Growth Factor-2*) als einer der wichtigsten Faktoren<sup>106</sup>. Für murine ES-Zellen ist nachgewiesen, dass LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) den JAK/STAT 3-Signalweg aktiviert und somit die Expression von Transkriptionsfaktoren induziert, die den pluripotenten Zustand der Zellen aufrecht erhalten<sup>40</sup>. Für *large scale* Kultivierungen von ES-Zellen stellt das Medium mit den zugesetzten Wachstumsfaktoren den entscheidenden Kostenfaktor dar. Aus diesem Grund ist es vorteilhaft, eine kostengünstige Quelle für die Zytokine in großer Menge und hoher Reinheit zu schaffen.

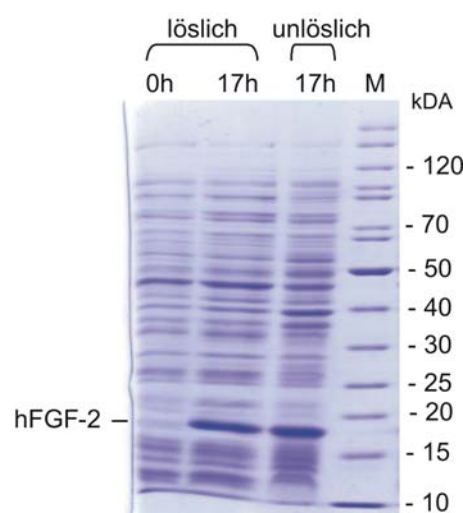
Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die humanen Formen der Zytokine FGF-2 und LIF Produktionsprozesse unter Verwendung rekombinanter *Escherichia coli* Stämme entwickelt. Diese werden im Folgenden beschrieben.

#### 3.1 Produktion von human Fibroblast Growth Factor-2

*Human Fibroblast Growth Factor-2* (hFGF-2, hbFGF) ist ein monomeres, nicht-glykosiliertes Polypeptid mit 154 Aminosäuren. Es besitzt keine Disulfidbrücken, weshalb es als matures Protein in *E. coli* exprimiert werden kann. Zur Expression wurde der rekombinante *E. coli* BL21 (DE3)pET29c-*hFGF-2* Stamm verwendet, der von Frau Dr. Ursula Rinas (Helmholz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig) zur Verfügung gestellt wurde. Der Vektor enthält eine synthetische<sup>107</sup> hFGF-2 cDNA-Sequenz *downstream* eines induzierbaren T7 Promoters.

### 3.1.1 Expression von hFGF-2 in *E. coli* BL21 (DE3)

Nach Start durch Zugabe von 1 % (v/v) Vorkultur wurden die Zellen in einem 500 ml Schüttelkolben (100 ml Kulturbrühe) in chemisch definiertem Medium M9 bei 30°C und 120 rpm kultiviert. Die Proteinexpression wurde bei einer optischen Dichte von 1,7 durch Zugabe von 0,2 mM IPTG induziert. Die Kultur wurde daraufhin über Nacht weiter geführt, die Zellernte erfolgte schließlich nach 24 h (17 h nach Induktion bei einer O.D. von 13). Zur Überprüfung der Proteinexpression wurde die Kulturbrühe zentrifugiert. Daraufhin wurde das Bakterienpellet in Bindungspuffer resuspendiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen, um nach erneuter Zentrifugation intrazelluläres lösliches Gesamtprotein (die lösliche Proteinfraction, das Zellysate) zu erhalten. Für die Analyse mittels SDS PAGE und Coomassie-Färbung wurden zudem intrazelluläres lösliches Gesamtprotein aus Zellen vor der Induktion sowie unlösliches Protein aus dem Zellpellet (unlösliche Fraction) zum Zeitpunkt der Ernte als Referenzen auf das Gel aufgetragen, siehe Abbildung 3.1.

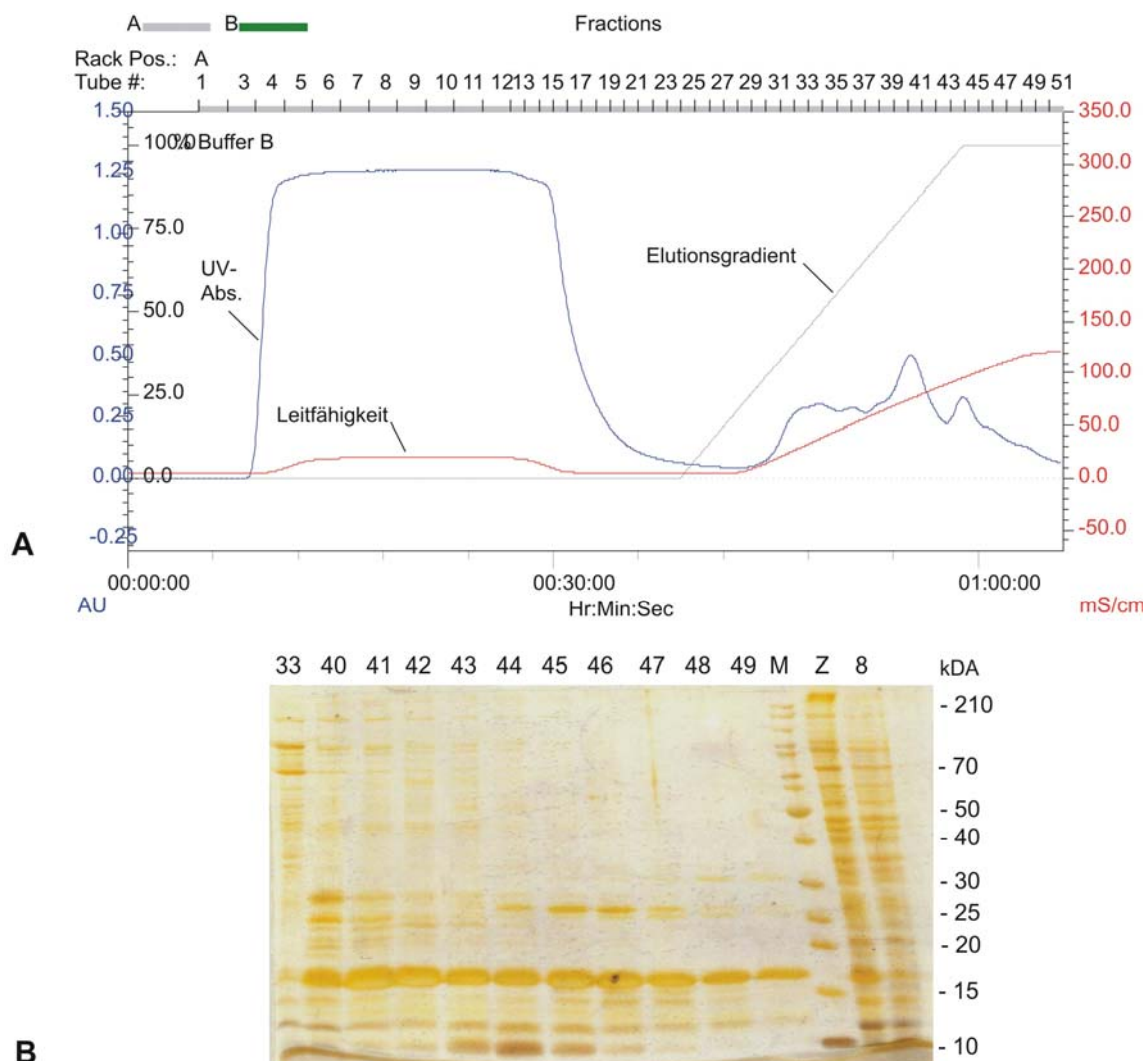


**Abbildung 3.1** SDS PAGE löslicher und unlöslicher Proteinfractionen. Angegebene Zeiten stellen Zeiten nach Induktion der Proteinexpression dar. Abkürzungen: M: Molekulargewichtsmarker (Fermentas SM0661), hFGF-2: human Fibroblast Growth Factor-2.

Die SDS PAGE Analyse zeigt, dass das rekombinante Protein 17 h nach der Induktion in der löslichen sowie in der unlöslichen Proteinfraction bei ca. 17 kDa exprimiert wurde. Die lösliche Proteinfraction wurde für eine 2-Stufenchromatographie zur Aufreinigung des Zytokins verwendet.

### 3.1.2 Aufreinigung von hFGF-2 mittels Kationenaustauschchromatographie (IEX)

Mit einem isoelektrischen Punkt von 9,6 ist hFGF-2 unter neutralen pH Bedingungen ein stark basisches Protein, sodass für den ersten Aufreinigungsschritt ein starker Kationenaustauscher in Form eines Sartobind S-Membranadsorbermoduls verwendet wurde. Nach Äquilibrieren mit Bindungspuffer wurde die Membran mit der Proteinprobe beladen. Anschließend wurde mit Bindungspuffer gewaschen bevor eine Gradientenelution folgte (0 → 1 M NaCl in Bindungspuffer, das genaue Protokoll ist in 6.6.3 zu finden). Ausgewählte Fraktionen wurden sodann mittels SDS PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert, siehe Abbildung 3.2.



**Abbildung 3.2** Ergebnis der Kationenaustauschchromatographie des löslichen Proteins aus dem *E. coli* Zelllysate. A: Chromatogramm. Darstellung der UV-Absorption und der Leitfähigkeit in Abhängigkeit von der Zeit (unten) bzw. der gesammelten Fraktionen (oben). Nummerierung oberhalb des Graphen: Einzelfraktionen von je 1 ml, linke Achse: UV-Absorption in willkürlichen Einheiten (AU, *arbitrary units*), rechte Achse: Leitfähigkeit in mS/cm<sup>2</sup>. B: SDS PAGE Analyse ausgewählter Fraktionen (nummeriert von 8 bis 49). Abkürzungen: Z: nicht aufgereinigtes Zelllysate. M: Molekulargewichtsmarker (Fermentas SM0661).

Ein großer Teil des Zellproteins passierte die Membran (siehe Abbildung 3.2 A, Durchbruchfraktionen Nr. 4-16). Ab einem Salzgehalt von 0,3 mM wurde anschließend gebundenes Protein in einem relativ breiten Bereich eluiert (Fraktionen 33-49, Abbildung 3.2 A und B). In der Durchbruchfraktion Nr. 8 war kein hFGF-2 mehr zu erkennen, was auf eine vollständige Bindung an den Membranadsorber schließen lässt. Erst ab einer Salzkonzentration von 0,7 mM NaCl wurde das hFGF-2 eluiert (ab Fraktion Nr. 40).

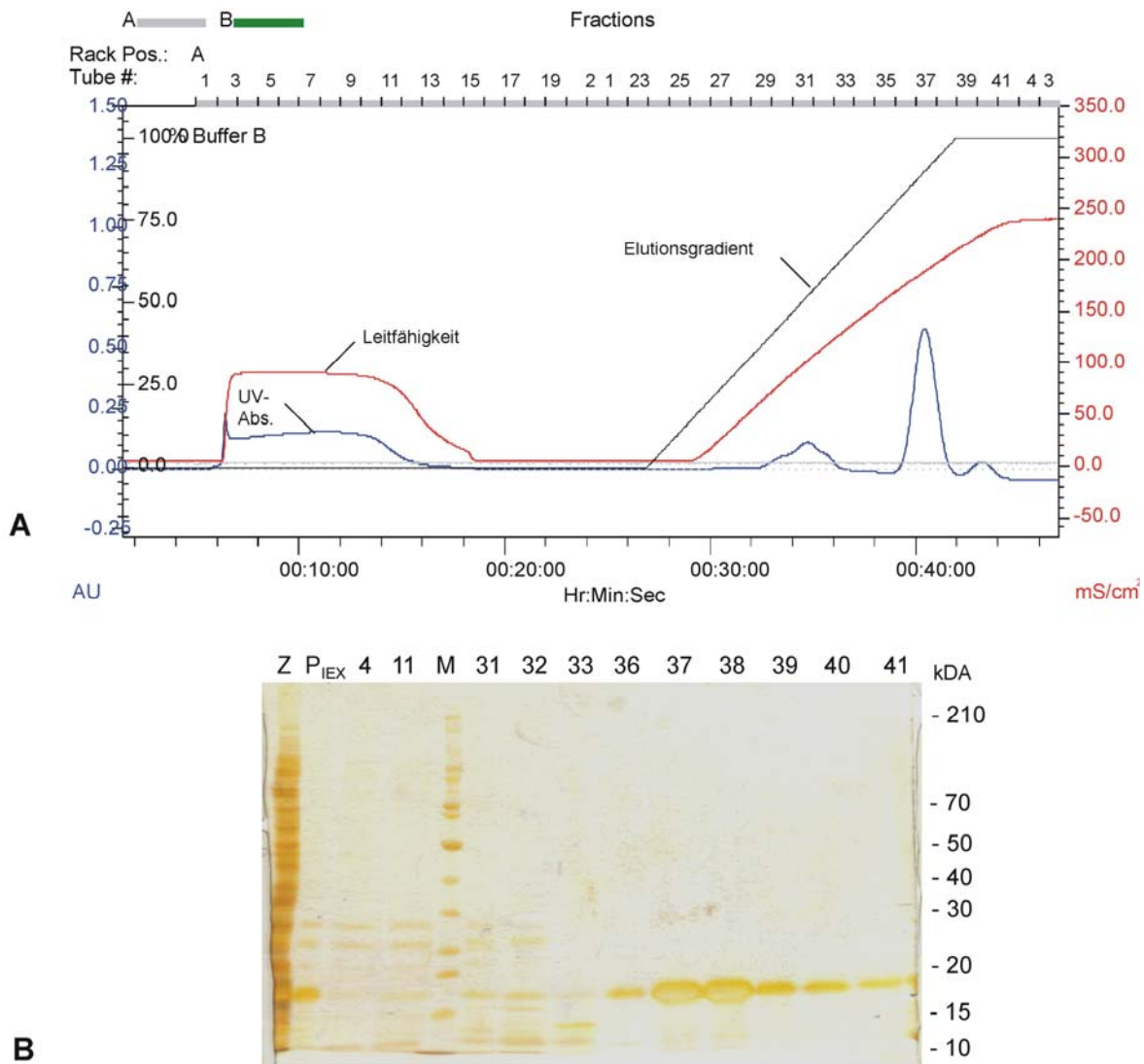
Es wurde außerdem sichtbar, dass alle hFGF-2-Fraktionen noch Verunreinigungen enthielten. Um diese zu entfernen, war ein zweiter Aufreinigungsschritt notwendig.

#### **3.1.3      *Affinitätschromatographie von hFGF-2 mittels Heparin***

Aus der Literatur ist eine hohe Affinität von hFGF-2 zu Heparinderivaten bekannt<sup>108, 109</sup>. Die gesammelten Elutionsfraktionen Nr. 39-49 (P<sub>IE</sub>) aus der Kationenaustauschchromatographie wurden hierfür zusammengeführt und ohne weiteres Umpuffern auf eine zuvor äquilibrierte Heparinsepharose-Säule geladen. Nach einem Waschschrift erfolgte auch hier die Elution mit einem Salzgradienten (0 → 2,5 M NaCl in Bindungspuffer).

In Abbildung 3.3 ist das Ergebnis der Affinitätschromatographie gezeigt. Nach einem breiten Durchbruchpeak erschienen mit steigendem Gradienten zwei weitere Peaks (Abbildung 3.3 A), von denen der zweite das Zielprotein hFGF-2 enthielt, wie in anschließender SDS PAGE und Silberfärbung gezeigt werden konnte (siehe Abbildung 3.3 B).

Dieses hat mit hoher Affinität an das Heparin gebunden und wurde, gut aufgetrennt von weiteren Wirtszellproteinen, mit einer Salzkonzentration von > 2 M NaCl eluiert. Es wurde hauptsächlich in den Fraktionen 37 und 38 nachgewiesen und war praktisch frei von Verunreinigungen. Die Reinheit wurde mittels SDS PAGE und Silberfärbung auf > 95 % geschätzt. Die beiden Fraktionen wurden gepoolt und einem Proteintest (nach Bradford, siehe Abschnitt 6.6.4) unterzogen. Anschließend wurde die hFGF-2-Lösung mit 0,01 % (w/v) BSA stabilisiert, bevor Aliquots hergestellt und bei -80°C gelagert wurden.



**Abbildung 3.3** Ergebnis der Affinitätschromatographie der gesammelten Elutionsfraktionen 39-49 aus der IEX. A: Chromatogramm. Darstellung der UV-Absorption und der Leitfähigkeit in Abhängigkeit von der Zeit (unten) bzw. der gesammelten Fraktionen (oben). Nummerierung oberhalb des Graphen: Einzelfraktionen von je 1 ml, linke Achse: UV-Absorption in willkürlichen Einheiten (AU, *arbitrary units*), rechte Achse: Leitfähigkeit in mS/cm<sup>2</sup>. B: SDS PAGE Analyse ausgewählter Fraktionen (nummeriert von 4 bis 41). Z: nicht aufgereinigtes Zelllysate. P<sub>IEX</sub>: Pool der Fraktionen 39-49 aus der vorangegangenen IEX. M: Molekulargewichtsmarker (Fermentas SM0661).



### **3.1.4            *Testung der biologischen Aktivität von hFGF-2***

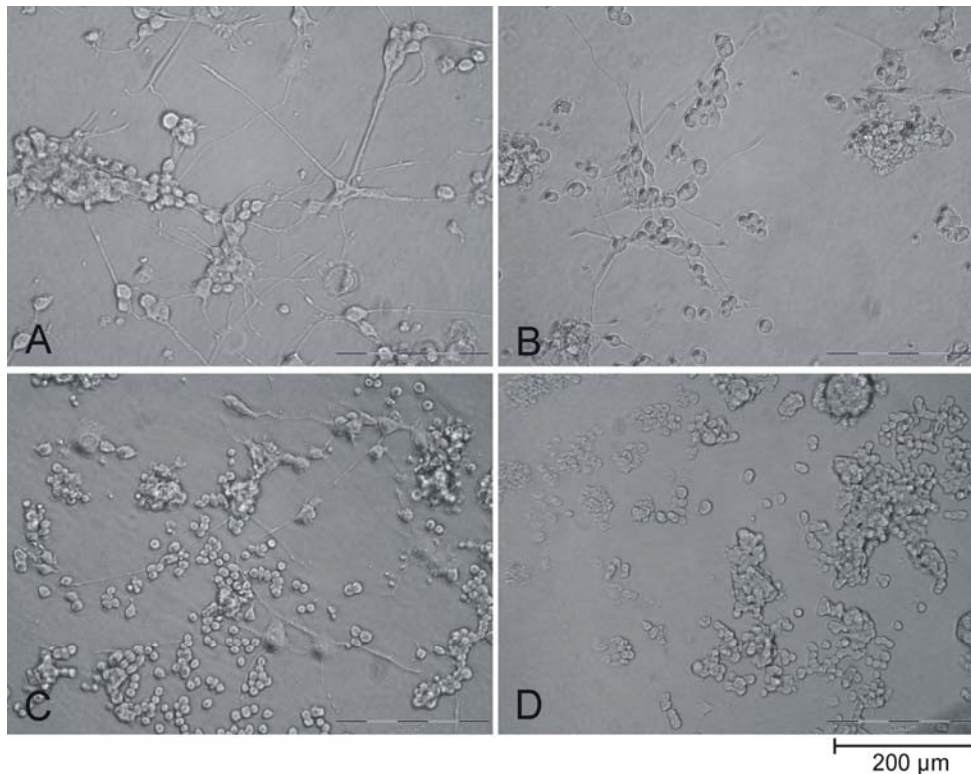
#### **3.1.4.1            Testung der biologischen Aktivität mit PC-12 Zellen**

Für den Fibroblastenwachstumsfaktor-2 sind zahlreiche Funktionen und Wirkungen auf Zielzellen beschrieben. So spielt FGF-2 bei der Wundheilung eine wichtige Rolle<sup>110</sup>, ferner weist er eine mitogene Funktion auf Endothelzellen auf und hat somit eine entscheidende Funktion bei der Angiogenese<sup>111</sup>. Darüber hinaus stimuliert er das Wachstum sowie die Neuritenausbildung von Neuronen<sup>112</sup>.

Als Modellzelllinie für neuronale Differenzierung und Entwicklung wurden in dieser Arbeit PC-12 Zellen<sup>113-115</sup> verwendet, um die biologische Aktivität des produzierten hFGF-2 zu untersuchen. Hierfür wurden PC-12 Zellen mit jeweils 100 ng / ml Nervenwachstumsfaktor (NGF, Sigma), hFGF-2 TB (der Firma Tebu-Bio PeproTech), dem aufgereinigten hFGF-2 (*E. coli* hFGF-2 TCI) und als Negativkontrolle ohne Faktor behandelt. Das Neuritenwachstum als Folge der neuronalen Differenzierung der PC-12 Zellen wurde in den folgenden Tagen mikroskopisch beobachtet und dokumentiert. NGF diente hierbei als interne Positivkontrolle für das Neuritenwachstum, kommerziell erhältliches hFGF-2 von Tebu-Bio Peprotech diente als Positivkontrolle für den aufgereinigten Faktor hFGF-2.

In Abbildung 3.4 sind mikroskopische Aufnahmen von PC-12 Zellen neun Tage nach Zytokinzugabe dargestellt. Im Ansatz mit NGF war das ausgeprägteste Neuritenwachstum erkennbar. Die PC-12 Zellen bildeten dagegen in Anwesenheit von hFGF-2 weniger Neuriten aus, diese waren zudem meist kürzer. Im Vergleich zur Negativkontrolle war jedoch ein eindeutiger Unterschied zwischen allen Kulturen mit bzw. ohne Zytokin erkennbar. In der Negativkontrolle waren keinerlei Neuriten zu erkennen und die Zellkörper verblieben klein und rund, wie es für undifferenzierte PC-12 Zellen typisch ist.

**Fazit:** PC-12 Zellen zeigten in Anwesenheit von NGF sowie hFGF-2 eine neuronale Differenzierung. Die Differenzierung der Zellen wurde morphologisch anhand von Neuritenausläufern beobachtet, weshalb sich dieser Test nur zu einer qualitativen Beurteilung der biologischen Aktivität des hergestellten hFGF-2 eignet. Aus diesem Grund wurde eine weitere Zelllinie zur Testung der biologischen Aktivität herangezogen, welche im folgenden Abschnitt in Anwesenheit von hFGF-2 charakterisiert wird.



**Abbildung 3.4** Lichtmikroskopische Aufnahmen von PC-12 Zellen nach 9 Tagen in Kultur mit A) NGF, B) hFGF-2 Tebu-Bio, C) *E. coli* hFGF-2 TCI, D) ohne Zytokin. In der Negativkontrolle ohne Zytokinzugabe bildeten sich keine Neuriten aus und die Zellkörper verblieben klein und rund.

#### 3.1.4.2 Testung der biologischen Aktivität mit NIH-3T3 Zellen

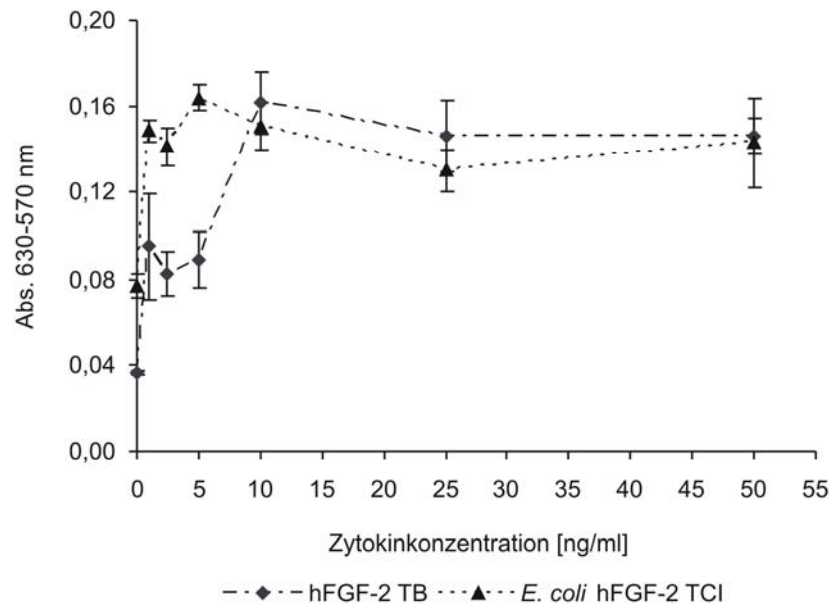
Um die Aktivität des aufgereinigten hFGF-2 quantitativ zu erfassen, wurde die Fibroblasten-Zelllinie NIH-3T3 verwendet. Grundlage dieses Aktivitätstests ist die proliferations-stimulierende Wirkung von hFGF-2 auf Fibroblasten<sup>116, 117</sup>. Die biologische Aktivität des hFGF-2 kann hierbei indirekt mittels MTT-Test sowie direkt anhand einer Zellzahlbestimmung ermittelt werden.

#### Bestimmung der Arbeitskonzentration von hFGF-2 für NIH-3T3 Kulturen

Um eine geeignete Arbeitskonzentration von hFGF-2 für Kulturen von NIH-3T3 Zellen zu bestimmen, wurden verschiedene Konzentrationen (0-50 ng/ml) des Zytokins ins Nährmedium (0,2 ml pro Kavität einer 96-Lochplatte) hinzugegeben (n=4 pro Konzentration). Als Positivkontrolle wurde das gleiche Experiment in Anwesenheit des kommerziell erhältlichen Standardproteins (hFGF-2 TB) durchgeführt. Zur Bestimmung der Viabilität wurde ein MTT-Test drei Tage nach Zytokinzugabe durchgeführt. Die Korrelation des Absorptionssignals beim MTT-Test mit der Zellzahl wurde in einem Vorversuch gezeigt

(siehe Abschnitt 6.7.1).

Der MTT-Test zeigte eine Dosis-abhängige Viabilität von NIH-3T3 Zellen in Anwesenheit von hFGF-2 (siehe Abbildung 3.5).



**Abbildung 3.5** Viabilität von NIH-3T3 Zellen in Abhängigkeit von der Zytokinkonzentration. Der MTT-Test wurde nach dem dritten Tag der Kultivierung durchgeführt. Angegeben sind Mittelwerte aus vier Werten  $\pm$  Standardfehler.

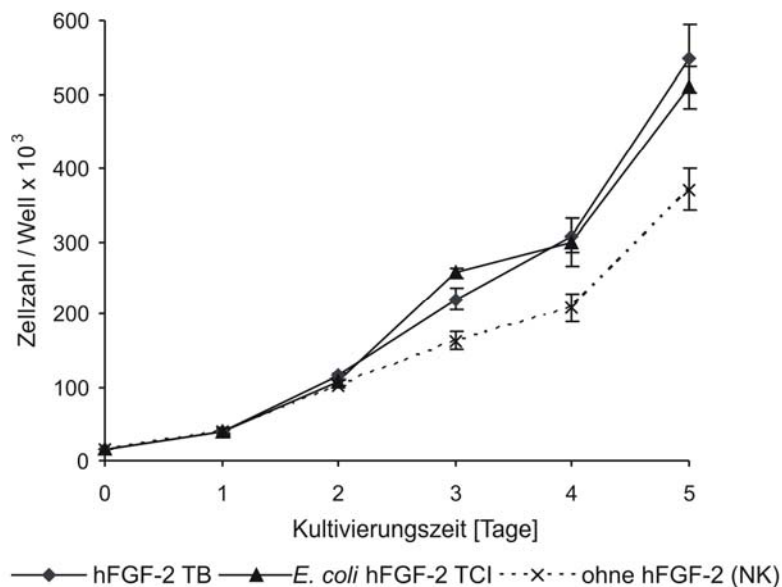
Aus dem Kurvenverlauf kann bei einer Zytokinkonzentration von ca. 5-10 ng / ml eine Sättigung des Absorptionssignals erkannt werden. Aus diesem Grund wurde eine Konzentration von 10 ng / ml als maximale effektive Dosis von hFGF-2 auf NIH-3T3 Zellen geschätzt. In Ansätzen mit höheren Konzentrationen konnte in beiden Fällen keine weitere Zunahme des Absorptionssignals erkannt werden. Folglich wurde eine hFGF-2-Konzentration von 10 ng / ml als Arbeitslösung für einen Proliferationstest mit direkter Zellzahlbestimmung verwendet, auf den im folgenden Abschnitt eingegangen wird.

#### Proliferation von NIH-3T3 Zellen in Anwesenheit von hFGF-2

In diesem weiteren Assay sollte die Proliferation von NIH-3T3 Zellen durch Zugabe von hFGF-2 erneut stimuliert werden. Anders als vorangegangenen Abschnitt sollte die Proliferation direkt bestimmt werden, das heißt über die Erstellung von Wachstumskurven von Kulturen, die mit kommerziellem hFGF-2 TB, dem aufgereinigten Faktor (*E. coli* hFGF-2 TCI) sowie ohne Zytokin (NK, Negativkontrolle) behandelt wurden. Das hFGF-2 wurde in

einer Konzentration von 10 ng / ml ins Medium hinzugegeben. Zellzahlen wurden täglich unter Zuhilfenahme einer Zählkammer bestimmt (n=4, an Tag 2 n=2).

NIH-3T3 Zellen zeigten ein stärkeres Wachstum in Anwesenheit von hFGF-2 als Zellen, die ohne Zytokin (NK, Negativkontrolle) kultiviert wurden (siehe Abbildung 3.6).



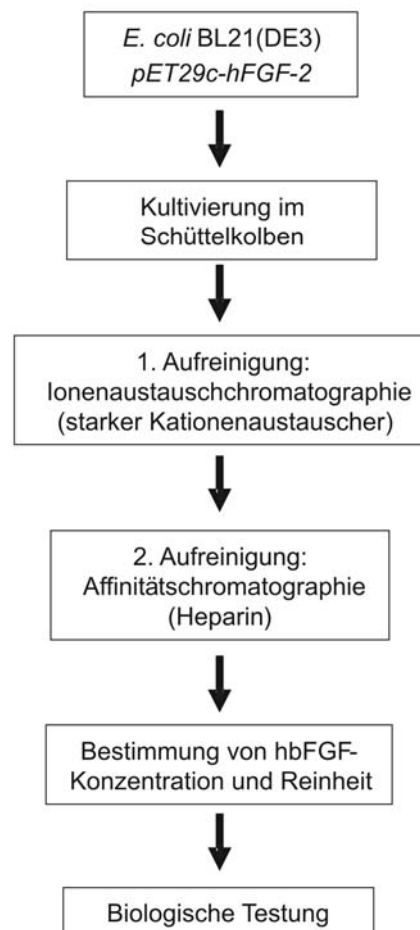
**Abbildung 3.6** Proliferation von NIH-3T3 Zellen in Anwesenheit von hFGF-2. Dargestellt sind Wachstumskurven in Medium mit zugesetztem kommerziellen hFGF-2 (TB, Tebu-Bio), dem aufgereinigten *E. coli* hFGF-2 TCI und in Medium ohne Zusatz von hFGF-2 (NK, Negativkontrolle).

Der Effekt von hFGF-2 wurde ab dem 3. Tag der Kultur sichtbar und wurde bis Tag 5 immer deutlicher. Anhand der Wachstumskurven von Kulturen mit dem kommerziellen und selbst hergestellten hFGF-2 wurde deutlich, dass die Aktivität des hergestellten *E. coli* hFGF-2 TCI vergleichbar war mit der Aktivität des kommerziellen Zytokins der Fa. Tebu-Bio (TB).

**Fazit:** Die Ergebnisse der beiden Tests zur Überprüfung der biologischen Aktivität demonstrieren, dass der hergestellte Wachstumsfaktor *E. coli* hFGF-2 TCI biologisch aktiv ist. Wurde er mit einem kommerziellen Standardprotein der gleichen Konzentration anhand von NIH-3T3 Kulturen verglichen, konnten keine signifikanten Unterschiede in der Proliferation der Zellen beobachtet werden.

### 3.1.5 Zusammenfassung und Diskussion des Produktionsprozesses für hFGF-2

In der vorliegenden Arbeit wurde das Zytokin hFGF-2 mittels rekombinanter *E. coli* Kulturen produziert, aufgereinigt und die biologische Aktivität erfolgreich nachgewiesen. Abbildung 3.7 zeigt ein Fließdiagramm des Produktionsprozesses, in dem die wesentlichen Schritte zusammengefasst sind. Nachdem geeignete Kultivierungsbedingungen im Schüttelkolben ermittelt wurden, fand eine 2-stufige Aufreinigung des Proteins statt. Es erfolgte eine Ionenaustauschchromatographie, mit der eine Abreicherung von Wirtsproteinen realisiert wurde. Nach einer Heparinsepharose-Affinitätschromatographie wurde das hFGF-2 als nahezu reines Protein erhalten.



**Abbildung 3.7** Fließdiagramm zur hFGF-2 Produktion. Dargestellt sind die wesentlichen Schritte des Herstellungsprozesses.

Der rekombinante *E. coli* Stamm konnte im Schüttelkolbenmaßstab zu hohen Zelldichten kultiviert werden, was in einer guten Ausbeute des Zielproteins resultierte. Aus 100 ml Kulturbrühe (entsprechend 0,32 g Biotrockenmasse) konnten 2,95 mg reines hFGF-2 erhalten

werden. Dieses wurde anhand von zwei Zelllinien im Hinblick auf die biologische Aktivität getestet. Während PC-12 Zellen in Anwesenheit des Zytokins mit Neuritenwachstum reagierten, konnte eine Dosis-abhängige Proliferation von NIH-3T3 Zellen beobachtet werden. Für den Proliferationstest wurde eine Konzentration von 10 ng/ml hFGF-2 verwendet, die in vorangegangenen Versuchen als maximale wirksame Dosis geschätzt wurde. Alternativ ist eine mathematische Bestimmung der ED<sub>50</sub> (der halbmaximalen effektiven Dosis) des aufgereinigten Proteins zum Beispiel nach der Methode von Alexander *et al.*<sup>118</sup> möglich. Diese wird häufig zur Charakterisierung kommerziell erhältlicher hFGF-2 Proteine angegeben und stellt einen international anerkannten Standard für biologisch aktive Proteine dar. Im Rahmen dieser Arbeit diente das entwickelte Protokoll der Zellbehandlung mit dem Zytokin als Grundlage für einen mittlerweile standardisierten Aktivitätstest für hFGF-2 am Institut für Technische Chemie. Dieser wurde von Antonina Lavrentieva weiterentwickelt<sup>119</sup>. Ferner wurden ausgehend von den Ergebnissen aus den Schüttelkolbenkultivierungen Bioreaktor basierte Fermentationsprozesse zur hFGF-2-Produktion im Maßstab von bis zu 2 L von Chen Ran entwickelt<sup>88</sup>.

## 3.2 Produktion von human Leukemia Inhibitory Factor

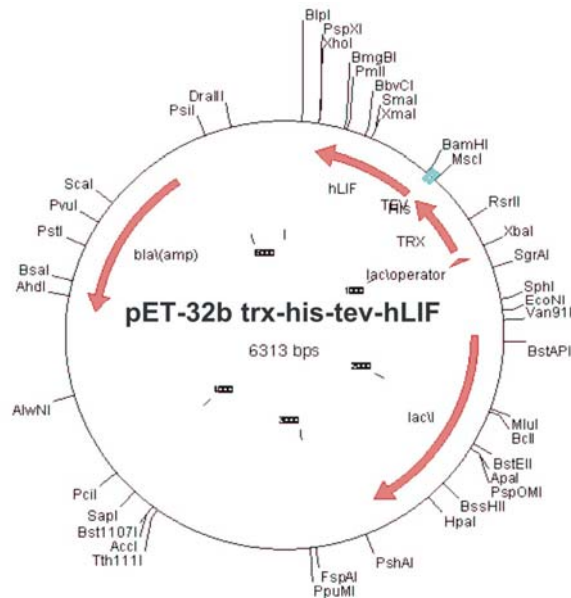
*Leukemia Inhibitory Factor* ist ein Polypeptid, das aus 180 Aminosäuren besteht und in Säugerzellen glykosiliert wird. Die posttranslationale Glykosilierung ist allerdings für die biologische Aktivität des Zytokins nicht zwingend erforderlich, so dass das Protein in *E. coli* produziert werden kann. Die Expression heterologer, insbesondere humaner Proteine in *E. coli* birgt jedoch häufig Schwierigkeiten. Oft ist eine Expression löslichen Proteins im Zytoplasma des Bakteriums nicht möglich, da die Proteine in unlöslichen Aggregaten, den so genannten Einschlusskörpern (*inclusion bodies*) ausfallen. Dabei liegen die rekombinanten Proteine denaturiert vor. Samal *et al.* haben gezeigt, dass eine direkte Expression von *human Leukemia Inhibitory Factor* (hLIF) in *E. coli* ausschließlich zu unlöslichem Protein führt<sup>120</sup>. Dieses musste demzufolge *in vitro* renaturiert und solubilisiert werden, bevor es aufgereinigt und eingesetzt werden konnte. Diese Herangehensweise ist allerdings zeitaufwändig und erfordert die individuelle Optimierung der Umfaltungsbedingungen für jedes Protein. Außerdem können die Renaturierungserträge niedrig sein und es bleibt fraglich, ob die Integrität des Proteins während des Umfaltungsprozesses gewahrt bleibt.

Ein anderer Ansatz, der häufig sowohl zeitsparender als auch kostengünstiger ist, ist die direkte Expression löslichen Proteins durch Änderung der Expressionsbedingungen zu bewirken. So haben Gearing *et al.* mithilfe eines Glutathion-S-Transferase Fusionskonstruktes eine teilweise lösliche Expression von hLIF in *E. coli* Kulturen erreicht<sup>121</sup>. In der vorliegenden Arbeit sollte ein neuer Prozess zur Herstellung von hLIF aus *E. coli* etabliert und optimiert werden. Dabei sollten besonders die bei der heterologen Expression in *E. coli* auftretenden Schwierigkeiten identifiziert und soweit wie möglich beseitigt werden. Deshalb sollte hLIF in einem Expressionssystem als Fusionsprotein mit der Oxidoreduktase Thioredoxin als Fusionspartner exprimiert werden, um eine Steigerung der Löslichkeit des Fusionsproteins gegenüber dem einzeln exprimierten hLIF zu erreichen. Thioredoxin reguliert den Redoxzustand im bakteriellen Zytoplasma<sup>105,103</sup> und soll dazu beitragen, dass die drei im hLIF Protein enthaltenen Disulfidbrücken ausgebildet werden und das Protein in seiner korrekten Konformation exprimiert wird.

### 3.2.1 Konstruktion des Expressionsvektors zur Produktion von hLIF

In diesem neuen Ansatz zur Produktion von hLIF wurde der Wirtstamm *E. coli* BL21 (DE3) herangezogen, welcher hierfür mit dem Expressionsvektor pET32b-*trx-his-tev-hLIF* transformiert wurde. Der Vektor wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Dr. Axel

Schambach (Institut für Experimentelle Hämatologie, Medizinische Hochschule Hannover) konstruiert. Das Zytokin hLIF soll in diesem Expressionssystem als lösliches Fusionsprotein mit N-terminalem Thioredoxin in *E. coli* exprimiert werden.



**Abbildung 3.8** Expressionsvektor pET32b-trx-his-tev-hLIF. Das Fusionskonstrukt trx-his-tev-hLIF besteht aus insgesamt 939 Basenpaaren und befindet sich unter der Kontrolle des induzierbaren T7-Promoters.

Grundlage der Klonierung war der Expressionsvektor pET32b (Novagen), der bereits eine Thioredoxin kodierende Sequenz enthielt. Die hLIF cDNA (herausamplifiziert aus dem pCAGGS-hLIF Vektor, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Ulrich Martin (Klinik für Herz-, Thorax-, Transplantations- und Gefäßchirurgie (HTTG), Medizinische Hochschule Hannover) wurde *downstream* an die Thioredoxinsequenz als BamHI / XhoI Fragment eingefügt. Die Thioredoxinsequenz war ihrerseits mit einem His-Tag sowie einer spezifischen TEV (*Tobacco Etch Virus*) Proteaseerkennungssequenz markiert (siehe Abbildung 3.8). Mit dieser Strategie sollte es ermöglicht werden, nach Aufreinigung des Fusionsproteins das hLIF Protein vom his-getagten Thioredoxin proteolytisch abzuspalten.

Das so generierte Fusionskonstrukt beinhaltet einen offenen Leserahmen von insgesamt 939 Basenpaaren und steht unter der Kontrolle eines induzierbaren T7 Promoters. Die komplette Sequenzabfolge des offenen Leserahmens ist in Abschnitt 6.4 zu finden. In Abbildung 3.9 ist das resultierende Fusionsprotein schematisch gezeigt. Es besteht aus einem N-terminalen Thioredoxinprotein, gefolgt von einer Sequenz von sechs Histidinen (His-tag), einer TEV-Proteaseerkennungssequenz von sieben Aminosäuren und dem Zielprotein hLIF. Zusammen ergibt dies ein Molekulargewicht von 34 kDa.

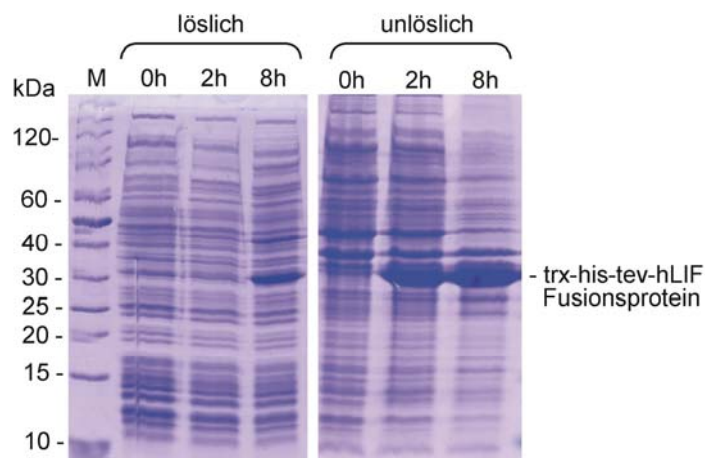




**Abbildung 3.9** Schematische Darstellung des Fusionsproteins von 34 kDa. Abkürzungen: N: aminoterminales Ende, trx: Thioredoxin, his: His-tag (6 x Histidin), tev: Erkennungssequenz der Tobacco Etch Virus Protease, hLIF: human Leukemia Inhibitory Factor, C: carboxyterminales Ende des Proteins.

#### 3.2.2 *Expression von hLIF als Fusionsprotein in E. coli BL21 (DE3)*

Nach Start durch Zugabe von 2 % (v/v) Vorkultur wurde der rekombinante *E. coli* Stamm in einem 500 ml Schüttelkolben (100 ml Kulturbrühe) in LB-Medium bei 23°C und 150 rpm kultiviert. Bei Erreichen einer optischen Dichte (O.D.) von ~ 0,8 erfolgte die Induktion der Expression des rekombinanten Proteins mit einer IPTG-Konzentration von 0,5 mM. Sieben bis neun Stunden nach der Induktion erfolgte die Zellernte (typischerweise bei einer O.D. von 2,0-2,5) und der Zellaufschluss mittels Ultraschall. Die löslichen und unlöslichen Proteinfractionen wurden durch Zentrifugation voneinander getrennt und mittels SDS PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert.



**Abbildung 3.10** SDS PAGE löslicher und unlöslicher Proteinfractionen. Angegebene Zeiten stellen Zeiten nach Induktion der Proteinexpression dar. Abkürzungen: M: Molekulargewichtsmarker (Fermentas SM0661).

Während das Fusionsprotein bereits zwei Stunden nach Induktion in großer Menge in Form unlöslicher *inclusion bodies* exprimiert wurde, erschien es zu einem etwas geringeren Teil nach 8 h in der löslichen Proteinfraction (siehe Abbildung 3.10). Die lösliche Expression wurde mit einer verringerten Wachstumsrate der Zellen zu diesem Zeitpunkt in Verbindung gebracht. Optimierungsversuche wie Variation der Medienzusammensetzung, ein weiteres Absenken der Kultivierungstemperatur oder eine Änderung der IPTG-Konzentration konnten keine signifikante Erhöhung des löslichen Proteinanteils bewirken.

Interessanterweise wurde das Protein zudem nur in einem kurzen Zeitintervall (ca. 7-9 h nach Induktion) exprimiert, wie zahlreiche Expressionsuntersuchungen gezeigt haben. Wurden die rekombinanten Bakterien länger als 9 h kultiviert, konnte kein Fusionsprotein mehr mittels SDS PAGE nachgewiesen werden, und zwar weder in der löslichen noch in der unlöslichen Fraktion. Dies ließ vermuten, dass das Zielprotein *in vivo* degradiert wurde, wenn die Kultur zu lange inkubiert wurde. Aus diesem Grund erfolgte eine Ernte der Kulturbrühe in der Regel acht Stunden nach Induktion, da dies den optimalen Zeitpunkt darstellte, zu dem ein zufriedenstellender Anteil löslichen Proteins vorhanden war.

#### **3.2.3 Metallchelataffinitätschromatographie (IMAC) des Fusionsproteins**

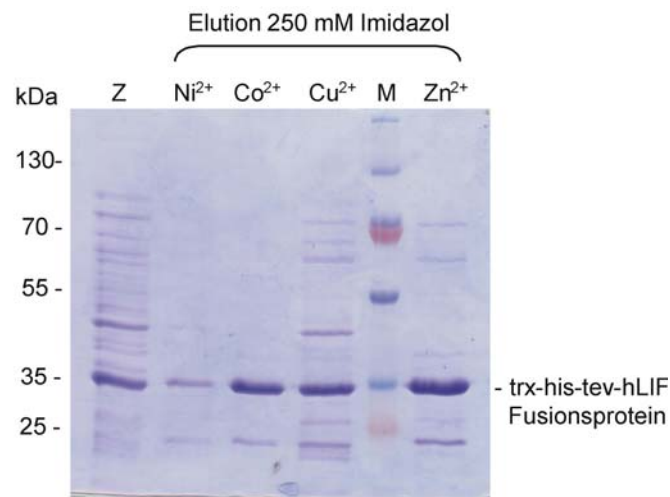
Um das lösliche Fusionsprotein aus dem *E. coli* Zelllysate aufzureinigen, wurde die geerntete Kulturbrühe zunächst zentrifugiert. Das erhaltene Bakterienpellet wurde anschließend auf eine O.D. von 10 in Bindungspuffer resuspendiert und aufgeschlossen. Nach erneuter Zentrifugation wurde die lösliche Proteinfraction (das Zelllysate) schließlich durch einen 0,2 µm Filter passiert.

#### **Ermittlung eines geeigneten Metallions für die IMAC mittels 8-Strips**

Die Bindung an die mit Metallionen funktionalisierte stationäre Phase kann von der Tertiärstruktur des aufzureinigenden Proteins und der Position des His-tags innerhalb der Aminosäurekette stark abhängen. Die Verwendung eines geeigneten Metallkations spielt für den Erfolg der Aufreinigung ebenfalls eine Rolle.

Aus diesem Grund wurde zunächst mit Hilfe von Vivawell 8-Strips eine Aufreinigung des Fusionsproteins im kleinen Maßstab durchgeführt. Neben der Testung vier verschiedener Metallionen sollten geeignete Pufferbedingungen für eine optimale Reinigung des Fusionsproteins aus dem *E. coli* Zelllysate ermittelt werden. Das detaillierte Protokoll dieser Test-Aufreinigungen befindet sich in Abschnitt 6.6.2 und wurde in Anlehnung an eine von Öznur Kökpınar etablierte Methode<sup>122</sup> durchgeführt, bei dem gebundenes Protein mit 250 mM Imidazol eluiert wird.

In Abbildung 3.11 sind die Ergebnisse der Aufreinigungen zu sehen. Während kaum Fusionsprotein von der mit Ni<sup>2+</sup> beladenen Membran eluiert wurde, war die entsprechende Proteinbande für Cu<sup>2+</sup> zwar deutlicher, aber im Vergleich zu den Elutionen von Kobalt- und Zinkionen viel stärker verunreinigt.



**Abbildung 3.11** SDS PAGE der Aufreinigung des Fusionsproteins über Vivawell 8-Strips (IDA, 5 Layer). Abgebildet sind die jeweiligen Fraktionen nach Elution mit 250 mM Imidazol. Abkürzungen: Z: nicht aufgereinigtes Zelllysate.  $\text{Ni}^{2+}$ : Nickel,  $\text{Co}^{2+}$ : Cobalt,  $\text{Cu}^{2+}$ : Kupfer,  $\text{Zn}^{2+}$ : Zink M: Molekulargewichtsmarker (Fermentas SM1811).

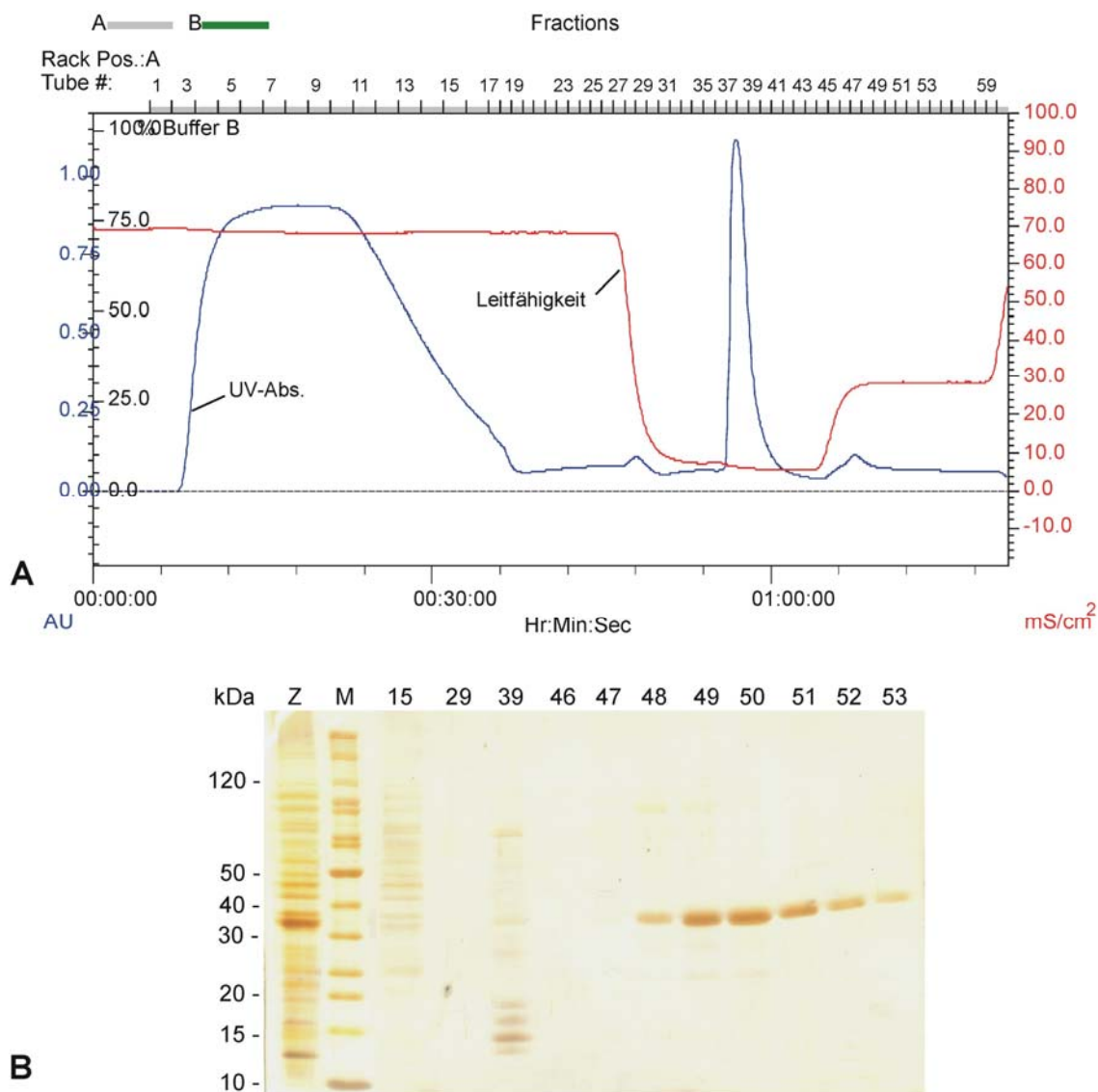
Da die Reinheit des Fusionsproteins nicht zufrieden stellend war, sollte in einem weiteren Test untersucht werden, ob mit der Verwendung eines „Vor“-Elutionspuffers mit 100 mM Imidazol unspezifisch gebundene *E. coli* Proteine von der Membran entfernt werden können. Zudem sollte getestet werden, ob die Elution des Fusionsproteins in einem Tris-Puffersystem realisiert werden konnte (anders als nach dem Originalprotokoll von Öznur Kökpınar<sup>122</sup>, bei dem mit einem  $\text{NaPHO}_4$ -Puffersystem gearbeitet wurde). Dies wäre im Hinblick auf die nachfolgende proteolytische Spaltung des Fusionsproteins vorteilhaft, da die Protease im Tris-Puffersystem ihr Aktivitätsoptimum aufweist.

Für diese Puffertests wurden nur noch die beiden Metallionen  $\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{Co}^{2+}$  verwendet. Es zeigte sich, dass nach einer vorangegangenen Elution mit 100 mM Imidazol ein erheblicher Teil unspezifisch gebundener Proteine entfernt und das Fusionsprotein mit 250 mM Imidazol in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 und 100 mM NaCl noch reiner als zuvor eluiert werden konnte.  $\text{Zn}^{2+}$  hat sich hierbei als das optimale Metallkation durchgesetzt (Daten nicht gezeigt).

In Anlehnung an die hier ermittelten optimalen Bedingungen folgte eine präparative Aufreinigung des hLIF Fusionsproteins, die im nächsten Abschnitt beschrieben wird.

### Aufreinigung des Fusionsproteins mittels FPLC

Die präparative Aufreinigung des Fusionsproteins erfolgte mit der FPLC-Anlage Bio DuoFlow (BioRad). Als stationäre Phase der Chromatographie diente ein IDA 75 Membranadsorbermodul. Die Membran wurde hierzu zunächst äquilibriert, woraufhin sie mit  $\text{Zn}^{2+}$ -Lösung funktionalisiert wurde. Nach anschließendem Entfernen von überschüssigem Metall mit Äquilibrationpuffer und Waschen mit Bindungspuffer wurde die Proteinprobe geladen.



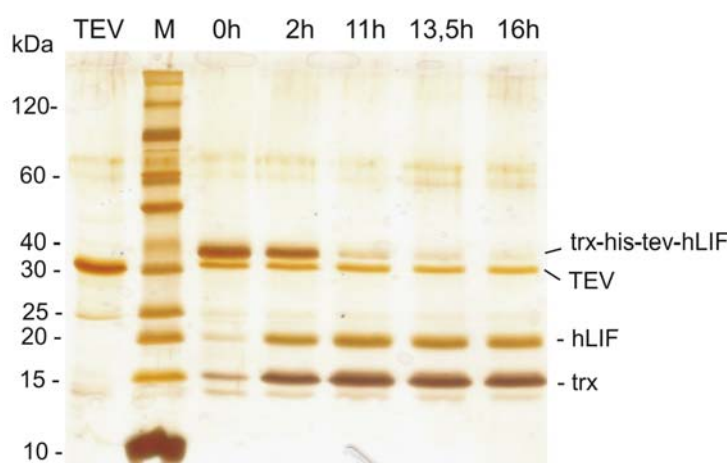
**Abbildung 3.12** Ergebnis der FPLC-Aufreinigung des Fusionsproteins *trx-his-tev-hLIF* aus dem *E. coli* Zelllysate. A: Chromatogramm. Darstellung der UV-Absorption und der Leitfähigkeit in Abhängigkeit von der Zeit (unten) bzw. der gesammelten Fraktionen (oben). Nummerierung oberhalb des Graphen: Einzelfraktionen von je 1 ml, linke Achse: UV-Absorption in willkürlichen Einheiten (AU, *arbitrary units*), rechte Achse: Leitfähigkeit in  $\text{mS}/\text{cm}^2$ . B: SDS PAGE Analyse ausgewählter Fraktionen (nummeriert von 15 bis 53). Abkürzungen: Z: nicht aufgereinigtes Zelllysate. M: Molekulargewichtsmarker (Fermentas SM0661).

Nach zwei Waschschritten erfolgte die Elution des Fusionsproteins. Zunächst wurde unspezifisch gebundenes Protein mit 100 mM Imidazol entfernt, anschließend erfolgte die eigentliche Elution des Fusionsproteins mit 250 mM Imidazol (das genaue Protokoll ist in Abschnitt 6.6.3 zu finden). In Abbildung 3.12 A ist das Chromatogramm dieser Aufreinigung dargestellt und Abbildung 3.12 B zeigt eine SDS PAGE Analyse ausgewählter Fraktionen nach Silberfärbung.

Das Fusionsprotein *trx-his-tev-hLIF* konnte mittels Metallchelataffinitätschromatographie aus dem *E. coli* Zelllysate aufgereinigt werden. Es wurde von der mit  $Zn^{2+}$ -Ionen funktionalisierten Membran bei pH 7,5 in 6 Fraktionen (48-53) mit 250 mM Imidazol ohne nennenswerte Verunreinigungen eluiert.

#### 3.2.4 *Proteolytische Spaltung des Fusionsproteins *trx-his-tev-hLIF**

Die Elutionsfraktionen, die das reine Fusionsprotein enthielten, wurden zusammengeführt und proteolytisch mittels TEV-Protease verdaut. Die Protease wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls hergestellt, der Produktionsprozess wird in Kapitel 3.2.8 beschrieben. Für den proteolytischen Verdau wurde ein Enzym- zu Substratverhältnis von 1:10 eingesetzt (das genaue Protokoll ist in Abschnitt 6.6.6 zu finden). Der Verdau wurde über Nacht bei 4°C durchgeführt.



**Abbildung 3.13** SDS PAGE des Verlaufs der proteolytischen Spaltung des *trx-his-tev-hLIF*-Fusionsproteins zu den angegebenen Zeitpunkten in Stunden. Abkürzungen: TEV: Tobacco Etch Virus (TEV)-Protease, M: Molekulargewichtsmarker (Fermentas SM0661), hLIF: human Leukemia Inhibitory Factor, trx: Thioredoxin.

Bereits nach 2-stündiger Inkubation des Fusionsproteins mit der TEV Protease waren folgende Proteinbanden zu beobachten: das freigesetzte hLIF bei 19,7 kDa und das

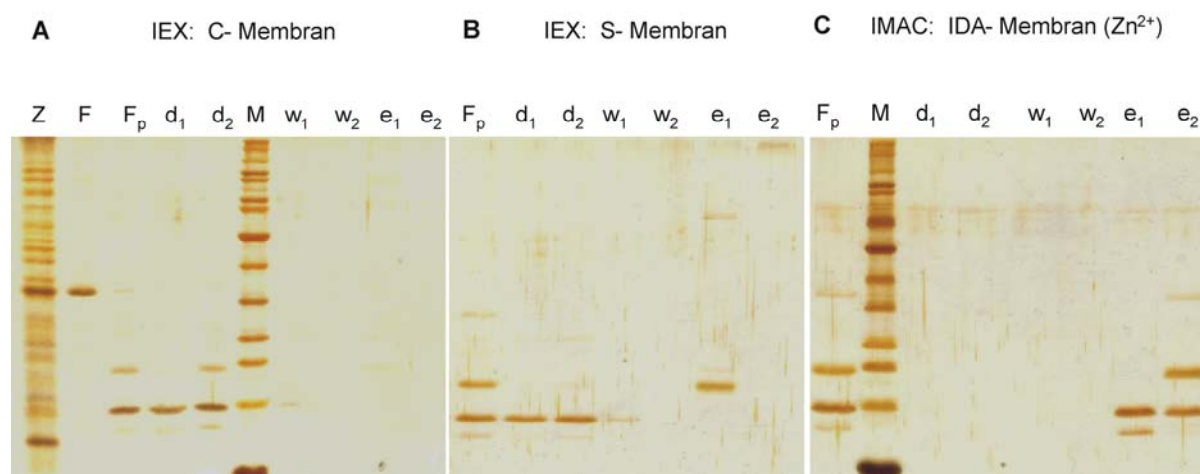
Thioredoxin, das den His-tag und die ersten 6 von 7 Aminosäuren der Proteaseerkennungssequenz enthält (14,3 kDa). Die Bande der Protease war bei 30 kDa wiederzufinden (siehe Abbildung 3.13). Im Laufe des weiteren Verdaus wurde die oberste Bande (des Fusionsproteins bei 34 kDa) immer schwächer und war nach 16 h mittels SDS PAGE und Silberfärbung kaum noch nachzuweisen. Unter diesen Bedingungen konnte von einem vollständigen Verdau nach 16 h ausgegangen werden. Die Löslichkeit des freigesetzten hLIF wurde nach erfolgter Filtration über einen 0,2 µm-Filter und erneuter SDS PAGE bestätigt (hier nicht dargestellt).

#### **3.2.5      *Aufreinigung von hLIF***

##### **Screening nach geeigneten Aufreinigungsmethoden**

Im Anschluss an die proteolytische Spaltung des Fusionsproteins galt es eine Aufreinigungsmethode zu finden, mit der das freigesetzte Zielprotein hLIF aus der Proteinmischung isoliert werden kann. Nahe liegend war eine erneute IMAC, mit der alle noch in der Probe vorhandenen His-getaggtten Proteine (evtl. unvollständig verdautes Fusionsprotein, das abgespaltene Thioredoxin und die TEV Protease) vom nicht getaggtten hLIF entfernt werden könnten. Dafür musste zunächst eine Dialyse der Proteinprobe durchgeführt werden, um das Imidazol aus der vorherigen IMAC des Fusionsproteins zu entfernen. Als Alternative kam eine Kationenaustauschchromatographie in Frage, über die das basische hLIF Protein (pI ~ 9,2) selektiv aus der verdauten Proteinprobe isoliert werden könnte.

Für das Screening von geeigneten Aufreinigungsmethoden wurden aufgrund der einfachen und schnellen Durchführbarkeit erneut Vivawell 8-*Strips* eingesetzt. Es wurden Carbonsäure-(C), Sulfonsäure (S)- sowie Iminodiessigsäure (IDA)- derivatisierte Membranen getestet (detaillierte Protokolle hierzu befinden sich in Abschnitt 6.6.2). In Abbildung 3.14 sind die Ergebnisse des Screenings gezeigt. Die C-Membran eignet sich nicht zur Isolierung des hLIF, da dieses nicht an den schwachen Kationenaustauscher bindet (siehe Abbildung 3.14 A, Durchbruchfraktion d2). Im Gegensatz dazu konnte mithilfe der S-Membran eine erfolgreiche Aufreinigung von hLIF erreicht werden (siehe Abbildung 3.14 B). Während Thioredoxin (pI ~ 5,7) im Durchbruch (d<sub>1</sub> und d<sub>2</sub>) erschien, wurde das hLIF selektiv an den starken Kationenaustauscher gebunden und erst nach zweimaligem Waschen mit 1000 mM NaCl eluiert (e<sub>1</sub>).



**Abbildung 3.14** Screening nach einer geeigneten Aufreinigungsmethode über 8-Strips. A und B: IEX: Kationenaustauschchromatographie. (C-: Carbonsäureligand, S-: Sulfonsäureligand), C: IMAC: Metallchelataffinitätschromatographie, IDA: *Iminodiacetic acid* (Imindiessigsäureligand),  $Zn^{2+}$ : Zink, Z: Zelllysate (lösliches Zellprotein), F: Fusionsprotein nach vorangegangener IMAC, F<sub>p</sub>: Produkte nach Verdau des Fusionsproteins, d<sub>1</sub>, d<sub>2</sub>: erste bzw. zweite Durchbruchfraktion, w<sub>1</sub>, w<sub>2</sub>: erste bzw. zweite Waschfraktion, e<sub>1</sub>, e<sub>2</sub>: erste bzw. zweite Elutionsfraktion.

Das Ergebnis der Aufreinigung über IMAC war unerwartet. Da das abgespaltene hLIF keinen His-tag enthält, sollte es bei dieser Aufreinigung im Durchbruch erscheinen. Jedoch hat es wie das Thioredoxin an die Membran gebunden und wurde erst mit 250 mM Imidazol von dieser eluiert (Abbildung 3.14 C, Elutionsfraktion e<sub>2</sub>). Dies könnte auf elektrostatische Wechselwirkungen des hLIF mit der funktionalisierten Membran zurückzuführen sein.

**Fazit:** Das nach proteolytischer Spaltung freigesetzte hLIF konnte über einen starken Kationenaustauscher aufgereinigt werden. Eine vorherige Dialyse der Proteinprobe war dabei nicht erforderlich. Die ermittelten Aufreinigungsbedingungen wurden für eine präparative FPLC verwendet, auf die im folgenden Abschnitt eingegangen wird.

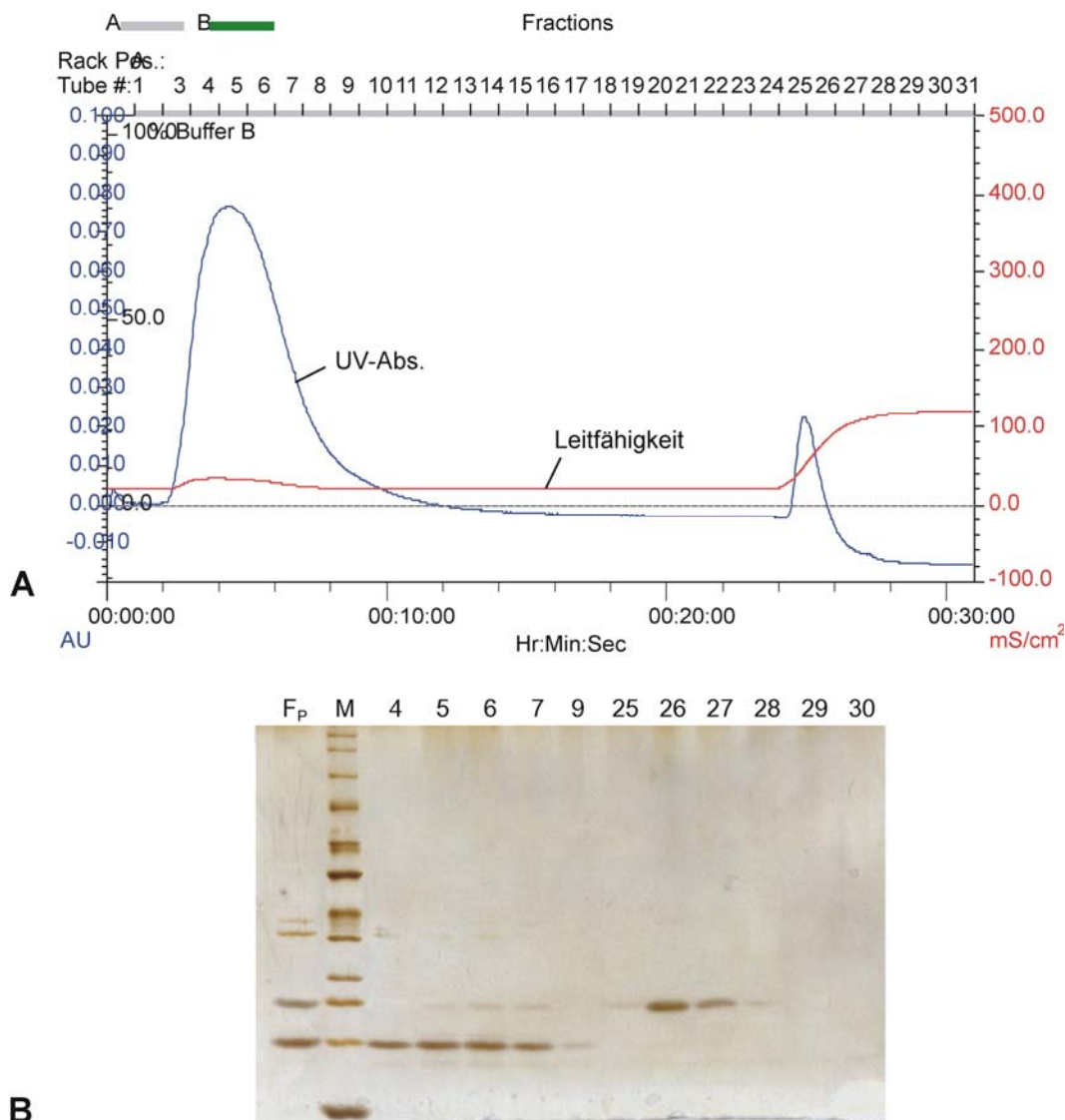
#### Aufreinigung mittels FPLC (Kationenaustauschchromatographie)

Die abschließende Reinigung von hLIF erfolgte mittels Kationenaustauschchromatographie unter Einsatz eines Sartobind Membranadsorbermoduls S 75. Hierfür wurde die Membran mit Bindungspuffer äquilibriert, woraufhin die Probenbeladung folgte. Nach einem Waschschriff mit Bindungspuffer wurde das hLIF mit 10-facher Salzkonzentration von der Membran eluiert (das genaue Protokoll befindet sich in Abschnitt 6.6.3).

Abbildung 3.15 A zeigt das Chromatogramm und in Abbildung 3.15 B ist eine SDS PAGE Analyse ausgewählter Fraktionen nach Silberfärbung zu sehen. Wie bereits mittels 8-Strips vorgetestet, hat das abgespaltene Thioredoxin unter diesen Bedingungen nicht an die



Kationenaustauschermembran gebunden und erschien im Durchbruch nach der Probenbeladung (Abbildung 3.15 B, Fraktionen 4-9). Auch Spuren der TEV-Protease bei 30 kDa waren im Durchbruch wiederzufinden. Das hLIF hingegen hat aufgrund seines basischen Charakters an die Membran gebunden und war kaum im Durchbruch zu beobachten.



**Abbildung 3.15** Ergebnis der FPLC-Aufreinigung des hLIF Proteins aus der verdauten Proteinprobe. A: Chromatogramm. Darstellung der UV-Absorption und der Leitfähigkeit in Abhängigkeit von der Zeit (unten) bzw. der gesammelten Fraktionen (oben). Nummerierung oberhalb des Graphen: Einzelfraktionen von je 1 ml, linke Achse: UV-Absorption in willkürlichen Einheiten (AU, *arbitrary units*), rechte Achse: Leitfähigkeit in  $\text{mS}/\text{cm}^2$ . B: SDS PAGE Analyse ausgewählter Fraktionen (nummeriert von 4 bis 30). Abkürzungen: F<sub>p</sub>: Produkte nach Verdau des Fusionsproteins. M: Molekulargewichtsmarker (Fermentas SM0661).

Sobald die Salzkonzentration einen Wert von ca. 500 mM erreichte, wurde das hLIF als reines Protein eluiert (Fraktionen 26 und 27 in Abbildung 3.15 B). Die Reinheit wurde

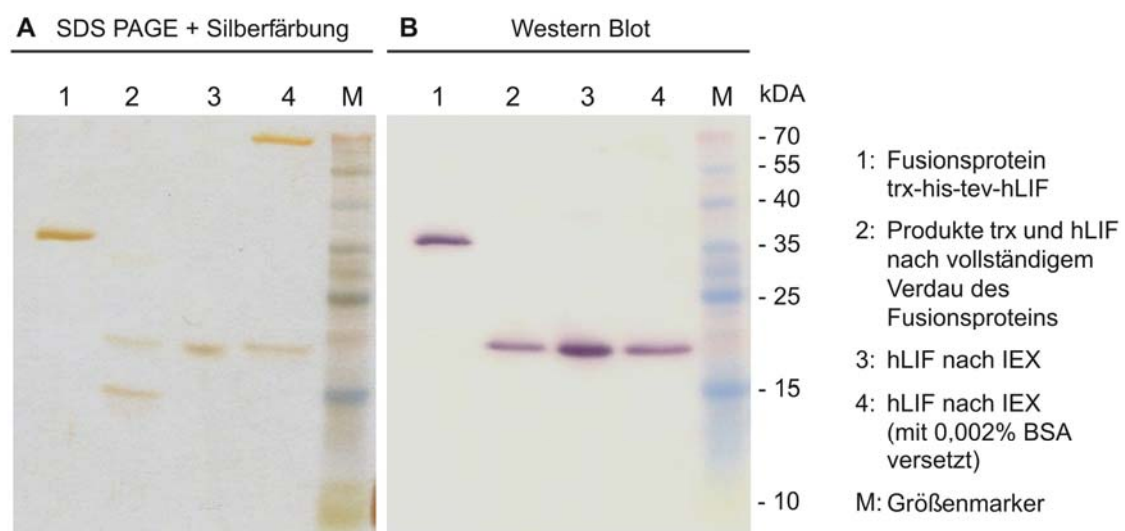


mittels SDS PAGE und Silberfärbung auf > 95 % geschätzt. Die entsprechenden Fraktionen wurden zusammengeführt und zur Bestimmung des Proteingehalts densitometrisch analysiert (siehe Abschnitt 6.6.5). Zur Stabilisierung des hLIF wurde die Proteinlösung mit 0,002 % (w/v) BSA versetzt, bevor sie aliquotiert und bei -80°C gelagert wurde.

#### 3.2.6 Nachweis von hLIF mittels Western Blot

Zur eindeutigen Identifizierung des Zytokins hLIF wurde ein Western Blot mit einem spezifischen monoklonalen hLIF Antikörper durchgeführt. Diese Analyse wurde freundlicherweise von Nina Bahnemann durchgeführt<sup>123</sup>. Dazu wurden verschiedene Proteinproben, die im Verlauf des Aufreinigungsprozesses erhalten worden waren, geblottet und zur Kontrolle mittels SDS PAGE und Silberfärbung sichtbar gemacht. Das genaue Protokoll des Western Blots ist in Abschnitt 6.6.7 zu finden.

Abbildung 3.16 A zeigt eine SDS PAGE der Proteinproben. In Abbildung 3.16 B ist das Ergebnis des zugehörigen Western Blots zu sehen. In Bahn Nr. 1 wird das hLIF innerhalb des Fusionsproteins detektiert. In Bahn Nr. 2 wird spezifisch nur das hLIF detektiert, nicht aber das Thioredoxin. Bahnen Nr. 3 und 4 zeigen den spezifischen Nachweis des hLIF im Anschluss an die Endreinigung über Ionenaustauschchromatographie.



**Abbildung 3.16** Identifizierung von hLIF mittels spezifischem Antikörper. A: SDS PAGE und B: zugehörige Western Blot Analyse von Proteinproben im Verlauf des Aufreinigungsprozesses. M: Molekulargewichtsmarker (Fermentas, SM0671), IEX: Ionenaustauschchromatographie.

### **3.2.7      *Testung der biologischen Aktivität von hLIF***

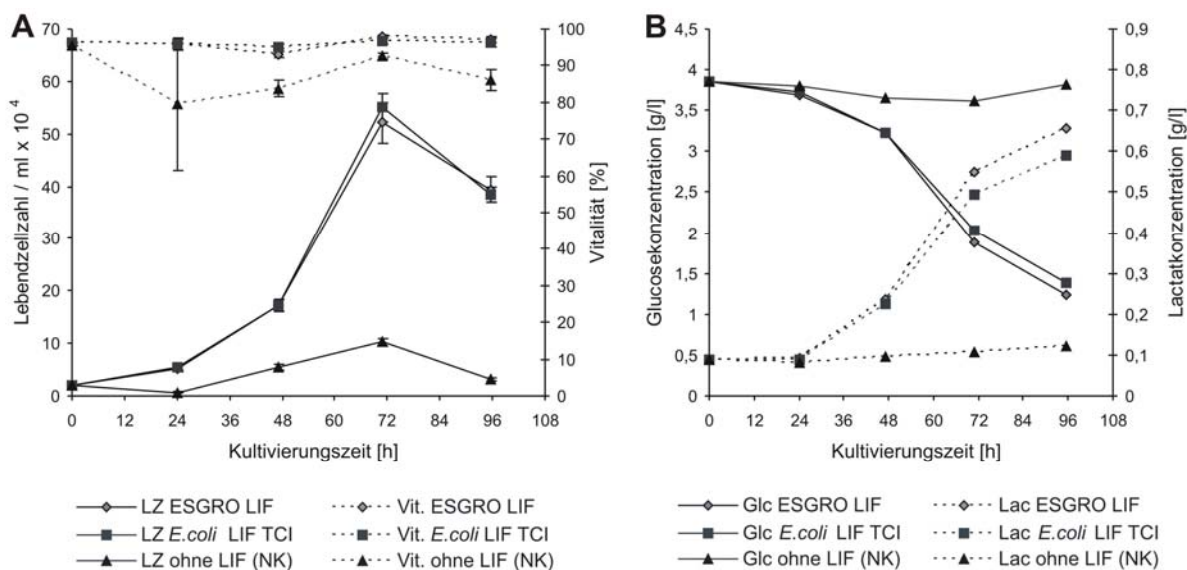
Für die Untersuchung der biologischen Aktivität wurden murine pluripotente Stammzellen verwendet, deren Proliferation und Pluripotenz von LIF reguliert werden. Im Rahmen der Aktivitätstestung wurden die Zellen in Gegenwart eines kommerziell erhältlichen (ESGRO LIF, Millipore GmbH) und des selbst produzierten Zytokins (*E. coli* LIF TCI) kultiviert. Als Negativkontrolle (NK) wurden Kulturen ohne LIF geführt. Die Testung der biologischen Aktivität von hLIF wurde in Zusammenarbeit mit Pierre Moretti<sup>124</sup> und Nina Bahnmann<sup>123</sup> durchgeführt.

#### **3.2.7.1      Testung der biologischen Aktivität mit murinen embryonalen Stammzellen Brachyury**

##### **Charakterisierung des Wachstums**

Das Proliferationsverhalten der embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) wurde anhand von Suspensionskultivierungen in Schüttelkolben untersucht. Hierbei wurden Wachstum und Vitalität über tägliche Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau-Ausschluss verfolgt. Mittels Annexin-V Assay wurden die Zellen außerdem auf Apoptose hin analysiert. Zusätzlich wurde die metabolische Aktivität der Zellen über Messungen von Glucose- und Lactat im Kulturmedium bestimmt. In Abbildung 3.17 A sind Wachstumskurven und Vitalität der ES-Zellen in den drei verschiedenen Medien dargestellt.

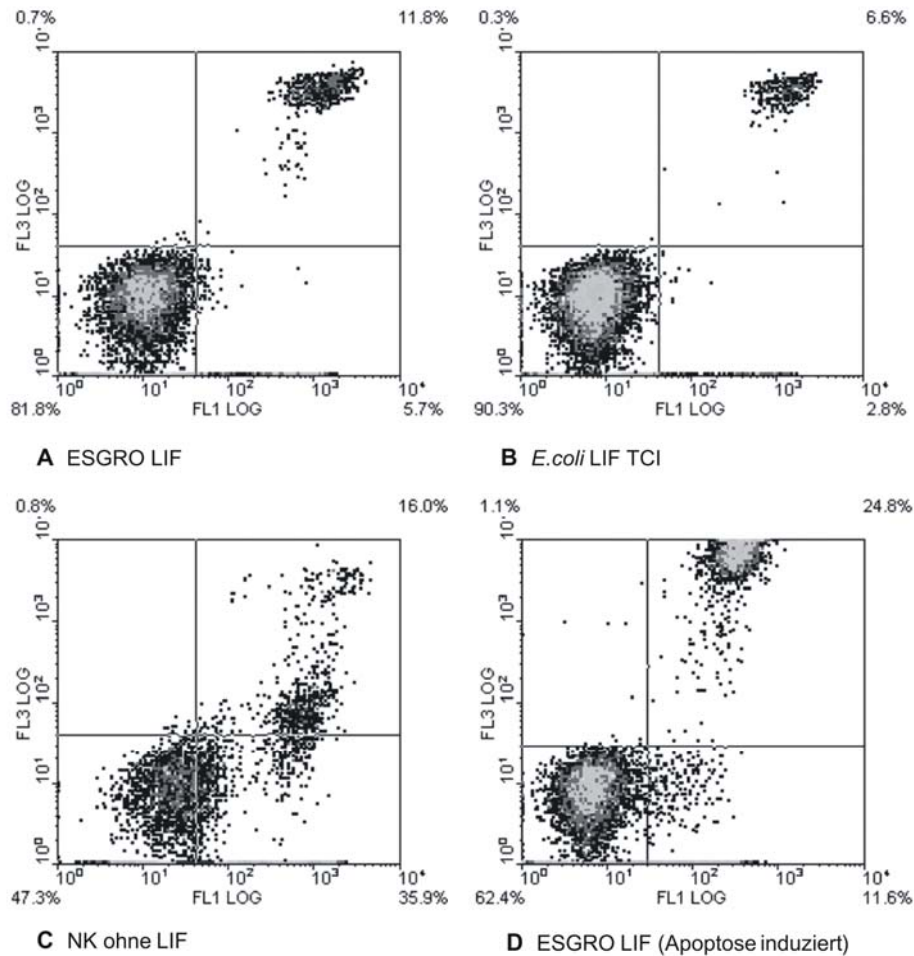
Anhand der Wachstumskurven wird deutlich, dass die beiden Kulturen mit kommerziellem (ESGRO LIF) und aufgereinigtem *E. coli* LIF TCI nahezu identisch verlaufen. Die Zellzahlen an den jeweiligen Kultivierungstagen sind vergleichbar. In der Kultur ohne Zusatz von LIF im Medium hingegen wird eine deutlich geringere Proliferation der ES-Zellen festgestellt. Das geringere Wachstum wurde durch die Messung von Glucose- und Lactatkonzentrationen im Medium bestätigt (Abbildung 3.17 B). Während Glucose so gut wie gar nicht verbraucht wurde, nahm auch Lactat als Stoffwechselprodukt im Verlauf der Kultivierung nicht zu. Neben der geringeren Proliferation und metabolischen Aktivität war auch die Vitalität der LIF freien Kultur im Vergleich zu den LIF haltigen Kulturen geringer (siehe Abbildung 3.17 A).



**Abbildung 3.17** Kulturen von ES-Zellen Brachyury. A: Dargestellt sind Wachstumskurven und Vitalität in Medium mit ESGRO LIF (Millipore), *E. coli* LIF TCI und in Medium ohne Zusatz von LIF (NK, Negativkontrolle). Angegeben sind Mittelwerte aus vier Werten  $\pm$  Standardfehler. B: Glucose- und Lactatkonzentrationen im Medium der jeweiligen Kulturen. Angegeben sind Werte einer Einfachbestimmung. Abkürzungen: LZ: Lebendzellzahl, Vit.: Vitalität, Glc: Glucose, Lac: Lactat.

Dies wurde bestätigt anhand von Annexin-V-Apoptosemessungen mittels Durchflusszytometrie (siehe Abschnitt 6.6.12). Das Protokoll zur durchflusszytometrischen Bestimmung der Apoptose wurde von Pierre Moretti entwickelt<sup>124</sup>. In Abbildung 3.18 sind die Ergebnisse der Apoptosemessungen zusammengefasst. Erneut sind keinerlei Unterschiede zwischen den Zellpopulationen aus den beiden LIF haltigen Kulturen zu erkennen (Abbildung 3.18 A und B). Im Gegensatz dazu weist ein erheblicher Anteil der Zellpopulation, die ohne LIF kultiviert wurde, Apoptose auf (Abbildung 3.18 C, Quadrant unten rechts). Demzufolge waren 35,9 % der Population apoptotisch. Eine Positivkontrolle des Annexin-V Assays erfolgte mit ES-Zellen, die mittels *trans*- $\beta$ -Nitrostyrol, einer bekannten Apoptose-induzierenden Substanz<sup>125, 126</sup>, behandelt wurden (siehe Abbildung 3.18 D).

Das apoptotische Verhalten der Zellen lieferte eine Erklärung dafür, dass keine kontinuierliche Kultur der ES-Zellen in LIF freiem Medium aufrechterhalten werden konnte. Dagegen konnten die ES-Zellen in LIF haltigem Kulturmedium über zahlreiche Passagen (insg. > 20) in Langzeitkultur gehalten werden. Dabei wurden stets vergleichbare Zellzahlen zwischen Kulturen mit kommerziellem und dem aufgereinigten LIF beobachtet.



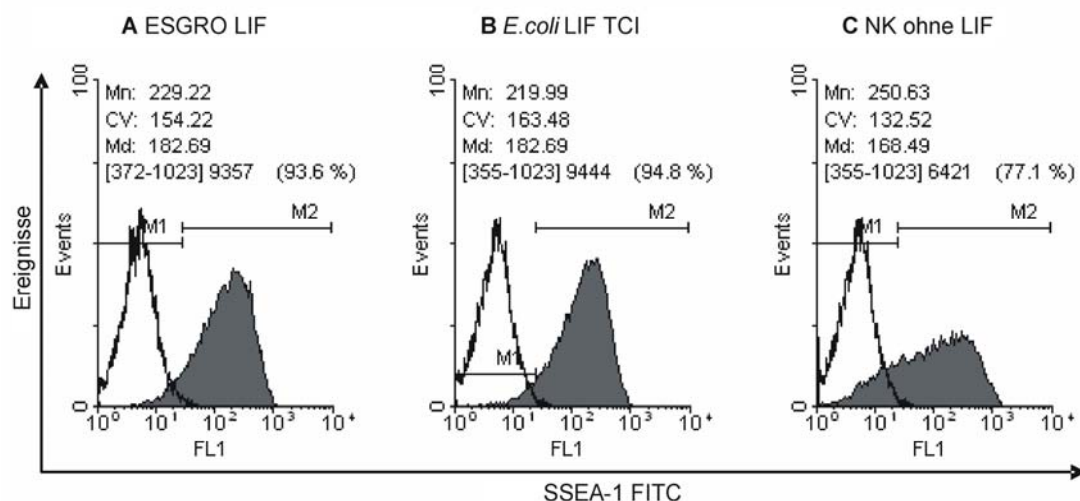
**Abbildung 3.18** Apoptosemessung von Brachyury ES-Zellen mittels Annexin-V Assay. Analyse der Zellen kultiviert (A) in Anwesenheit des Kontroll-LIF Proteins (ESGRO LIF), (B) des aufgereinigten *E. coli* LIF TCI, (C) in Abwesenheit von LIF (Negativkontrolle, NK) und (D) in Anwesenheit des Kontroll-LIF Proteins (ESGRO LIF) nach induzierter Apoptose mit *trans*- $\beta$ -Nitrostyrol.

Hinsichtlich der Wirkung auf das Zellwachstum und die Vitalität war das aufgereingte hLIF Protein vollkommen vergleichbar mit dem kommerziell erhältlichen Zytokin. Der Erhalt der Pluripotenz der ES-Zellen ist jedoch ein weiterer bedeutender Aspekt der Charakterisierung des aufgereinigten Proteins.

### Nachweis der SSEA-1 Expression

SSEA-1 ist ein wichtiger Pluripotenzmarker muriner embryonaler Stammzellen (siehe Tabelle 1 in Abschnitt 2.1.1) und wird spezifisch auf der Oberfläche undifferenzierter muriner ES-Zellen exprimiert. Die SSEA-1 Expression von Brachyury ES-Zellen während der Langzeitkultivierung wurde in regelmäßigen Abständen durchflusszytometrisch analysiert. Hierzu wurden die Zellen mit einem monoklonalen FITC-markierten Antikörper inkubiert. Positive Färbung wurde definiert als die Emission eines Fluoreszenzsignals, das größer war als das Signal der Zellen, die mit Isotypkontroll-Antikörpern inkubiert worden waren. Um tote Zellen aus der Analyse auszuschließen, wurde Propidiumiodid (PI) hinzugefügt (das detaillierte Protokoll befindet sich in Abschnitt 6.6.11).

In Abbildung 3.19 sind beispielhafte Histogramme gezeigt, die die SSEA-1 Expression der Zellen aus den drei verschiedenen Kultivierungsansätzen repräsentieren. Zellen in Kultur in Anwesenheit des aufgereinigten *E. coli* LIF TCI wiesen ein hohes SSEA-1 Expressionsniveau auf (> 94 % positive Zellen), das gänzlich mit dem der Positivkontrolle vergleichbar war (Abbildung 3.19 A und B). Ohne LIF kultivierte Zellen hingegen zeigten bereits nach zwei Passagen in LIF freier Kultur eine Abnahme der SSEA-1 Expression (lediglich 77 % positive Zellen, Abbildung 3.19 C).



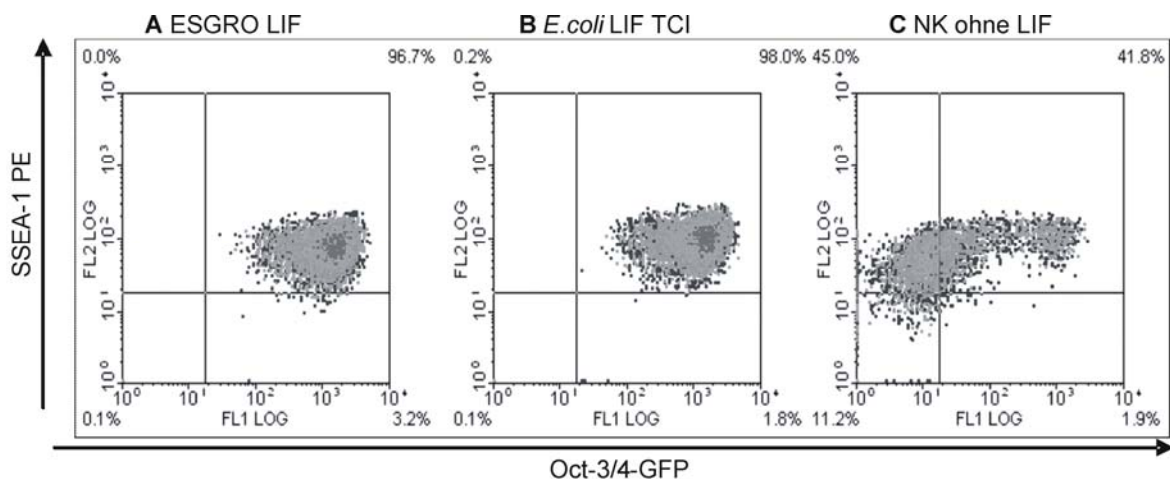
**Abbildung 3.19** SSEA-1 Expression von Brachyury ES-Zellen. Expressionsniveaus der Zellen kultiviert (A) in Anwesenheit des Kontroll-LIF Proteins (ESGRO LIF), (B) des aufgereinigten *E. coli* LIF TCI und (C) in Abwesenheit von LIF (Negativkontrolle, NK) sind dargestellt. Ausgefüllte Histogramme: mit Anti-SSEA-1 FITC Antikörper gefärbte Zellen. Nicht ausgefüllte Histogramme: mit entsprechendem Isotypkontroll-Antikörper gefärbte Zellen. Lebende Zellen wurden anhand der Propidiumiodidsignale gated.

### 3.2.7.2 Testung der biologischen Aktivität mit induzierten pluripotenten Stammzellen YM100

Die biologische Aktivität des LIF wurde zusätzlich an induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen) getestet. Hierfür wurden murine YM100 Zellen verwendet, die ein GFP-Reporterprotein unter der Kontrolle des endogenen Oct-3/4 Promoters enthalten, da sie aus OG2-Fibroblasten<sup>127</sup> hergestellt wurden. Diese Tatsache konnte für die LIF-Testung ausgenutzt werden, indem die grüne Fluoreszenz als direktes Maß für die Aktivität des LIFs herangezogen werden konnte.

Die iPS-Zellen YM100 (Klon „M15“) wurde über fünf kontinuierliche Passagen Feederzellfrei in statischer Suspension in Gegenwart von kommerziellem und dem produzierten Zytokin kultiviert. Als Negativkontrolle wurden wiederum Kulturen ohne LIF geführt. Die Expression von Oct-3/4 wurde durchflusszytometrisch anhand der GFP-Expression analysiert. Parallel dazu erfolgte eine Messung der Expression von SSEA-1. Hierfür wurde ein mit Phycoerythrin (PE) markierter monoklonaler Antikörper verwendet. Durch Zugabe von PI wurden tote Zellen aus der multiparametrischen Analyse ausgeschlossen.

In Abbildung 3.20 sind die Ergebnisse dieser Messung dargestellt.



**Abbildung 3.20** Density Plots (zweidimensionale Darstellungen) der Oct-3/4 -zu SSEA-1 Expression von iPS-Zellen in Kultur mit (A und B) und ohne LIF (C). Zellen wurden mit einem Anti-SSEA-1 PE Antikörper gefärbt, während die Oct-3/4 Expression anhand des GFP-Signals quantifiziert wurde. Lebende Zellen wurden anhand der Propidiumiodidsignale gegatet.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Populationen beobachtet werden, wenn LIF im Kulturmedium enthalten war (Abbildung 3.20 A und B). Nahezu alle Zellen verblieben nach fünf kontinuierlichen Passagen positiv für beide Pluripotenzmarker Oct-3/4

und SSEA-1 (oberer rechter Quadrant). Im Gegensatz dazu war in der Negativkontrolle eine signifikante Verschiebung des Oct-3/4-Signals zu erkennen (Abbildung 3.20 C). Nur noch 41,8 % der Zellpopulation exprimierte Oct-3/4 (Quadrant oben rechts) und 11,2 % der Population war negativ für beide Pluripotenzmarker Oct-3/4 und SSEA-1 (unterer linker Quadrant). Wie bei den Brachyury ES-Zellen beobachtet, konnte auch keine Langzeitkultur von suspendierten iPS-Zellen bei Abwesenheit von LIF aufrechterhalten werden.

Die Funktionalität des aufgereinigten Zytokins hLIF konnte erfolgreich anhand zweier pluripotenter Stammzelllinien demonstriert werden. Neben des Erhalts der Selbsterneuerung und Pluripotenz wurde eine unverminderte Proliferation der Zellen beobachtet.

**Fazit:** In dem hier beschriebenen Produktionsprozess für die humane Form des Zytokins LIF wurde eine Überexpression löslichen Fusionsproteins durch das Vorhandensein eines N-terminalen Thioredoxins realisiert. Die niedrige Kultivierungstemperatur unterstützte die Löslichkeit erheblich. Über einen His-tag wurde das Fusionsprotein zunächst aus dem Zelllysate aufgereinigt. Die Pufferbedingungen sind daraufhin optimiert worden, dass die darauf folgende Abspaltung des Zielproteins aus dem Fusionsprotein direkt ohne vorheriges Umpuffern durchführbar war. Auch die anschließende Aufreinigung des hLIF aus der verdauten Proteinprobe mittels Kationenaustauschchromatographie war unter den optimierten pH- und Salzbedingungen möglich und erlaubte reproduzierbare Aufreinigungsprozesse. Dies eliminierte Proteinverluste, die während Umpufferungsprozeduren auftreten und reduzierte gleichzeitig das Risiko der Proteinpräzipitation. Die biologische Aktivität des produzierten hLIF wurde an murinen embryonalen sowie induzierten pluripotenten Stammzellen erfolgreich demonstriert. Im Vergleich zum kommerziell erhältlichen (murinen) LIF „ESGRO“ der Fa. Millipore zeigte das hergestellte hLIF stets vergleichbare Aktivität in selbiger Arbeitskonzentration.

Wie in Abschnitt 3.2.4 gezeigt, wird im Rahmen des hLIF-Produktionsprozesses die TEV-Protease benötigt, um nach erfolgter Aufreinigung des Vorläufer-Fusionsproteins das Zielprotein hLIF proteolytisch abzuspalten. Um unabhängig von kommerziellen Quellen für diese Protease zu sein und um den gesamten hLIF Produktionsprozess so wirtschaftlich wie möglich zu gestalten, sollte die TEV-Protease eigens rekombinant hergestellt werden. Der Produktions- und Aufreinigungsprozess der Protease wird im folgenden Abschnitt näher erläutert.

### **3.2.8      *Produktion von Tobacco Etch Virus Protease***

Die TEV-Protease (Proteinase NIa), ist eine hochspezifische Cysteinprotease, die aus dem *Tobacco Etch Virus* (TEV) stammt<sup>128</sup>. Aufgrund ihrer hohen Spezifität wird sie häufig eingesetzt, um in rekombinanten Proteinen Markierungssequenzen oder andere Fusionsproteine abzuspalten. Die TEV-Protease erkennt eine Konsensussequenz aus den sieben Aminosäuren Glu-X-X-Tyr-X-Gln-Ser/Gly. Dabei kann an den mit X markierten Positionen fast jeder Aminoacylrest stehen<sup>129</sup>. Die Protease katalysiert die Hydrolyse der Peptidbindung zwischen den konservierten Aminosäuren Gln und Ser/Gly<sup>128</sup>.

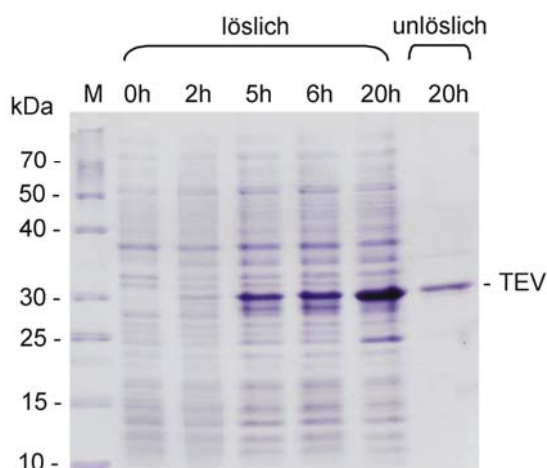
Die Produktion der TEV-Protease erfolgte unter Verwendung des Wirtstammes *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS, der hierfür mit dem Expressionsvektor pTH24:TEV<sup>130</sup> transformiert wurde. Der Vektor wurde freundlicherweise von Frau Dr. Ursula Rinas (Helmholz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig) zur Verfügung gestellt und erlaubte die Expression der TEV-Protease mit einer C-terminalen Folge von sechs Histidinresten (His-tag). Die Protease sollte somit über IMAC aufgereinigt werden können.

#### **3.2.8.1      Expression von TEV-Protease in *E. coli* Rosetta pLysS (DE3)**

Die Produktion der TEV-Protease wurde im 100 ml-Schüttelkolbenmaßstab von Henrik Neubacher durchgeführt<sup>131</sup>. Nach Start der Kultivierung durch Zugabe von 1 % (v/v) Vorkultur wurden die Zellen bei 37°C bis zu einer OD von ca. 0,6 in TB-Medium inkubiert. Während des Prozesses der Überexpression sollte ein möglichst großer Teil des Zielproteins in löslicher Form exprimiert werden, um die Notwendigkeit einer Rückfaltung des Proteins aus unlöslichen Einschlusskörpern zu umgehen. Deshalb wurde nach Induktion der Expression mit 1 mM IPTG eine niedrige Kultivierungstemperatur von 20°C gewählt. Nach 20 h Inkubation wurde die Kulturbrühe geerntet und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde daraufhin in Phosphat-Bindungspuffer auf eine O.D. von 10 resuspendiert. Nach dem Zellaufschluss mittels Ultraschall wurde erneut zentrifugiert, um Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen abzutrennen. Zur Überprüfung der Expression der TEV-Protease in löslichen und unlöslichen Fraktionen in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer erfolgte eine Analyse mittels SDS PAGE und anschließender Coomassie-Färbung.



In Abbildung 3.21 ist das Ergebnis der Expressionsuntersuchung zu sehen. Bereits 5 h nach Induktion konnte die TEV-Protease bei 30 kDa als lösliches Protein erhalten werden. Nach 20 h war eine deutliche Überexpression des Proteins in der löslichen (sowie zum Teil auch in der unlöslichen) Fraktion zu beobachten.



**Abbildung 3.21** SDS PAGE löslicher und unlöslicher Proteinfractionen. Angegebene Zeiten stellen Zeiten nach Induktion der Proteinexpression dar. Abkürzungen: M: Molekulargewichtsmarker (Fermentas SM0661), TEV: Tobacco Etch Virus Protease.

Zu diesem Zeitpunkt hat die Bakterienkultur ihre höchste Zelldichte erreicht (in der Regel O.D. Werte zwischen 5,5 und 6). Die lange Kultivierungsdauer hatte somit im Gegensatz zur Expression des hLIF (siehe Abschnitt 3.2.2) keinen negativen Einfluss auf die Stabilität oder Löslichkeit des rekombinanten Proteins sondern erlaubte es, die Satzkultur bis zum Erreichen der maximalen Zelldichte durchzuführen.

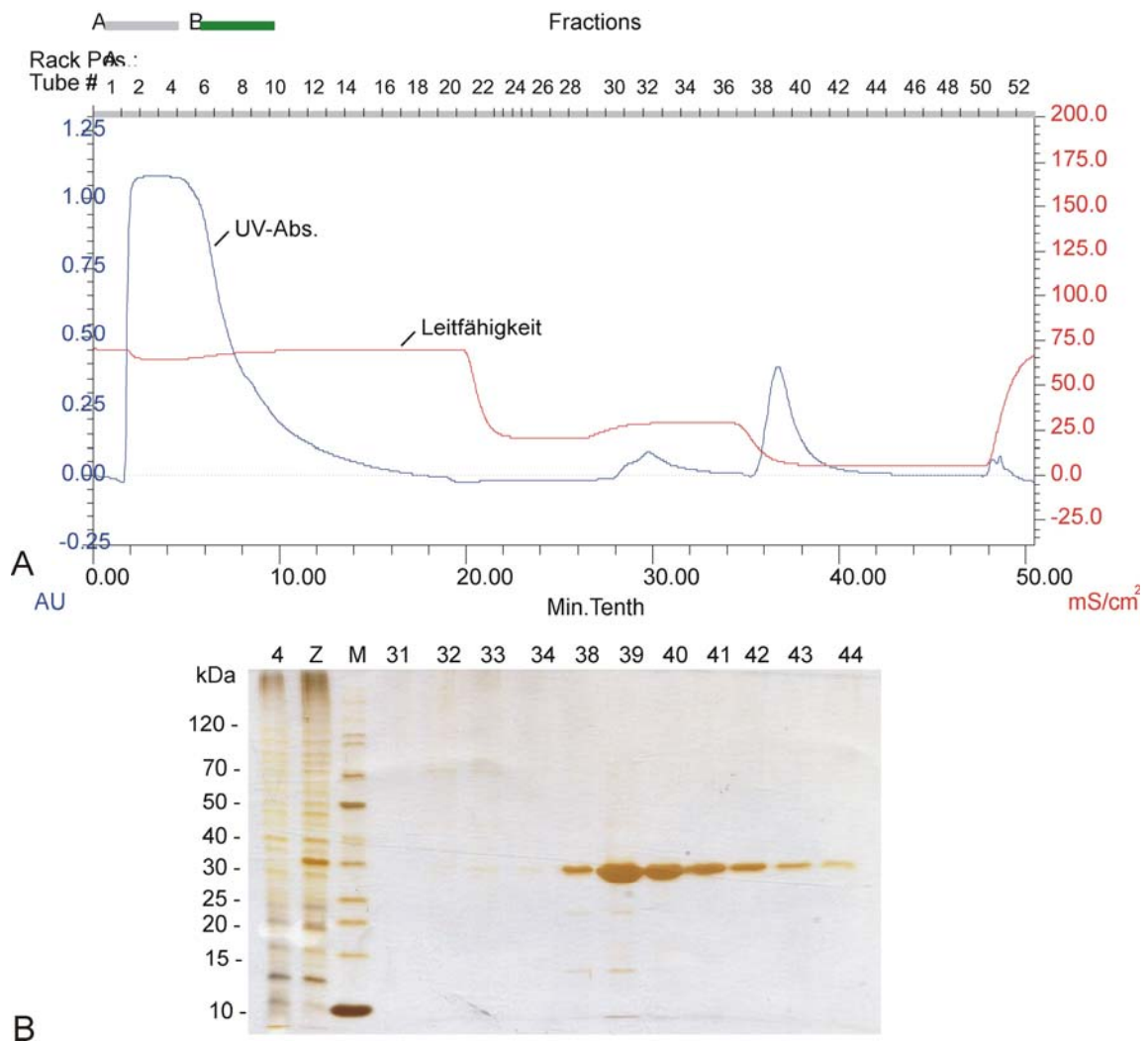
#### 3.2.8.2 Metallchelataffinitätschromatographie

Die TEV-Protease sollte aus der löslichen Fraktion des Zelllysats per Metallchelataffinitätschromatographie (IMAC) mittels FPLC über einen Membranadsorber (Sartobind IDA 75) aufgereinigt werden. Diese Arbeiten wurden von Henrik Neubacher durchgeführt<sup>131</sup>. Zunächst erfolgten Optimierungsversuche bezüglich des Puffersystems und die Ermittlung eines geeigneten Metallkations mittels Vivawell 8-*Strips*. Demnach hat sich  $\text{Zn}^{2+}$  als geeignet herausgestellt (siehe Abschnitt 6.7.2). Ziel war es, die TEV-Protease in einem Puffersystem zu eluieren, welches in der Zusammensetzung möglichst jenem ähnelte, in dem die TEV-Protease enzymatische Aktivität zeigte und das für den Verdau des trx-his-tev-hLIF Fusionsproteins genutzt wurde (siehe Abschnitt 6.6.6). Aus Vorversuchen mit einer

kommerziellen TEV-Protease (Gibco) war bekannt, dass sich das Fusionsprotein bei pH 8 in 50 mM Tris-HCl proteolytisch spalten lässt. Aus diesem Grunde wurde für den gesamten Aufreinigungsprozess der produzierten TEV-Protease ein Puffersystem mit 50 mM Tris-HCl gewählt; der Aufreinigungsprozess wird im Folgenden dargestellt.

Die filtrierte Proteinlösung wurde zunächst mit Bindungspuffer auf die Membran aufgetragen. Daraufhin wurde zunächst mit Waschpuffer und „Vor“-Elutionspuffer gewaschen. Anschließend wurde gebundenes Protein mit Elutionspuffer inklusive 50 % Glycerin von der Membran eluiert (das genaue Protokoll befindet sich in Abschnitt 6.6.3). Die gesammelten Fraktionen wurden mittels SDS PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.22 zu sehen.

Es ist zunächst zu erkennen, dass in der Durchbruchfraktion Nr. 4 keine TEV-Protease nachweisbar war, was für eine sehr gute Bindung der Protease an die Membran spricht. Die Elution des Proteins erfolgte mit 250 mM Imidazol. Besonders in den Fraktionen 39 und 40 liegt die Protease offenbar in reiner Form (~ 95 %) vor. Es konnte gezeigt werden, dass eine erfolgreiche Elution der TEV-Protease mit einem Elutionspuffer möglich ist, der 50 % Glycerin enthält. Diese Tatsache war vorteilhaft, denn so konnte die TEV-Protease direkt nach der Aufreinigung im Elutionspuffer eingefroren werden. Aus Vorversuchen war bekannt, dass die Aktivität der Protease in Abwesenheit von Glycerin beim Einfrieren vollständig verloren geht. Durch das Hinzufügen von 50 % Glycerin in den Elutionspuffer entsteht keine weitere Verdünnung durch nachträgliche Glycerinzugabe. Der Proteingehalt der Protease-Elutionsfraktionen wurde densitometrisch bestimmt (siehe Abschnitt 6.6.5).



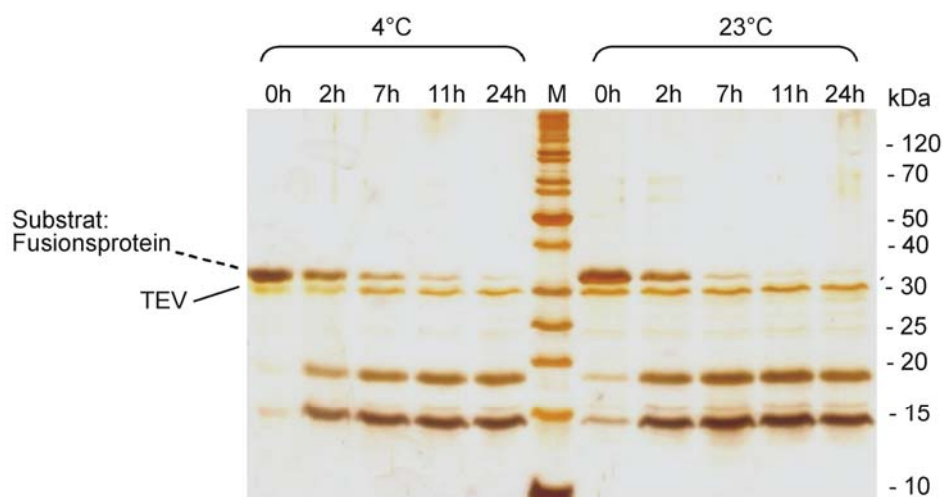
**Abbildung 3.22** Ergebnis der FPLC-Aufreinigung der TEV-Protease aus dem *E. coli* Zelllysate. A: Chromatogramm. Darstellung der UV-Absorption und der Leitfähigkeit in Abhängigkeit der Zeit (unten) bzw. der gesammelten Fraktionen (oben). Nummerierung oberhalb des Graphen: Einzelfraktionen von je 1 ml, linke Achse: UV-Absorption, rechte Achse: Leitfähigkeit in mS/cm². B: SDS PAGE Analyse ausgewählter Fraktionen (nummeriert von 4 bis 44). Abkürzungen: Z: nicht aufgereinigtes Zelllysate. M: Molekulargewichtsmarker (Fermentas SM0661).

#### 3.2.8.3 Aktivitätsbestimmung der TEV-Protease

Im Anschluss an die erfolgte Aufreinigung der Protease sollten optimale Bedingungen für die proteolytische Spaltung des Substrat-Fusionsproteins *trx-his-tev-hLIF* ermittelt werden. Diese Arbeiten wurden von Ana Leticia Vanz und Maria Zahid aus Frau Dr. Ursula Rinas Arbeitskreis durchgeführt. Hierfür wurden Parameter wie Temperatur oder der pH-Wert untersucht. Darüber hinaus wurden Mengenverhältnisse von Enzym zu Substrat variiert. Wie bereits im vorherigen Abschnitt (3.2.8.2) erwähnt, war das Vorhandensein von Glycerin essentiell für das Einfrieren und somit die Langzeitlagerung der Protease. Daher wurde der

minimal notwendige Anteil von Glycerin während der Lagerung bei -20°C bestimmt.

Im Folgenden wird exemplarisch eine Aktivitätsbestimmung anhand eines mittels SDS PAGE verfolgten zeitlichen Verlaufs des proteolytischen Verdaus gezeigt. In diesem Fall wurde der Einfluss der Temperatur auf die Aktivität der Protease untersucht. Hierfür wurden zwei identische Inkubationsansätze von Protease und Fusionsprotein in 50 mM Tris-HCl bei pH 8 bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt. In Abbildung 3.23 ist das Ergebnis dieser Aktivitätsuntersuchung dargestellt. Während zum Zeitpunkt 0 h lediglich die Protease (30 kDa) und das Substrat (34 kDa) zu beobachten waren, erschienen bereits nach 2 h die beiden Spaltprodukte der Proteolyse (Banden bei 15 und 20 kDa). Gleichzeitig verringerte sich die Bandenintensität des Substrats. Werden die Intensitäten bei 4°C und 23°C miteinander verglichen, so konnte im 23°C-Ansatz nach 11 h kein nennenswertes Fusionsprotein mehr beobachtet werden. Die entsprechende Bande war bei 4°C hingegen etwas deutlicher zu erkennen. Nach 24 h der Inkubation jedoch konnte in beiden Fällen ein vollständiger Verdau angenommen werden. Da die Aktivität der Protease nicht signifikant von der Temperatur abhängig war, wurde in den folgenden proteolytischen Spaltungen stets eine Temperatur von 4°C gewählt. Im Hinblick auf die biologische Aktivität des frei zu setzenden Zielproteins war die niedrige Temperatur bedeutsam.



**Abbildung 3.23** Temperaturabhängige Aktivitätsbestimmung der aufgereinigten TEV-Protease. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der proteolytischen Spaltung des Substrat-Fusionsproteins zu den angegebenen Zeitpunkten in Stunden. Abkürzungen: TEV: Tobacco Etch Virus (TEV) Protease, M: Molekulargewichtsmarker (Fermentas SM0661),

Analog zu diesem Vorgehen wurden sukzessive weitere Inkubationsparameter optimiert.

Diese zielten darauf ab, einerseits die optimalen Hydrolysebedingungen für die Protease zu

schaffen. Andererseits wurden Punkte berücksichtigt, die für die weitere Prozessierung des freigesetzten Zielproteins von Bedeutung waren. Der pH-Wert des proteolytischen Verdau wurde von ursprünglich 8 auf 7,5 gesenkt. Wurde das Zielprotein hLIF bei pH 7,5 freigesetzt, konnte es direkt in diesem Puffer auf die Ionenaustauschmembran der nachfolgenden Aufreinigung geladen werden.

So wurden für den proteolytischen Verdau des Fusionsproteins trx-his-tev-hLIF Parameter ermittelt, die hinsichtlich des Gesamtprozesses die optimalen Bedingungen schafften. Diese Bedingungen beinhalteten letztlich ein 50 mM Tris-HCl-Puffersystem mit einem pH-Wert von 7,5 und der Zugabe von 100 mM EDTA. Der Verdau wurde bei 4°C mit einem Substrat- zu Protease- Mengenverhältnis von 10:1 durchgeführt und war in der Regel nach 16 h abgeschlossen. Wurde die Protease mit 50 % Glycerin im Elutionspuffer aufgereinigt, behielt sie noch Wochen nach dem Einfrieren bei -20 °C ihre enzymatische Aktivität.

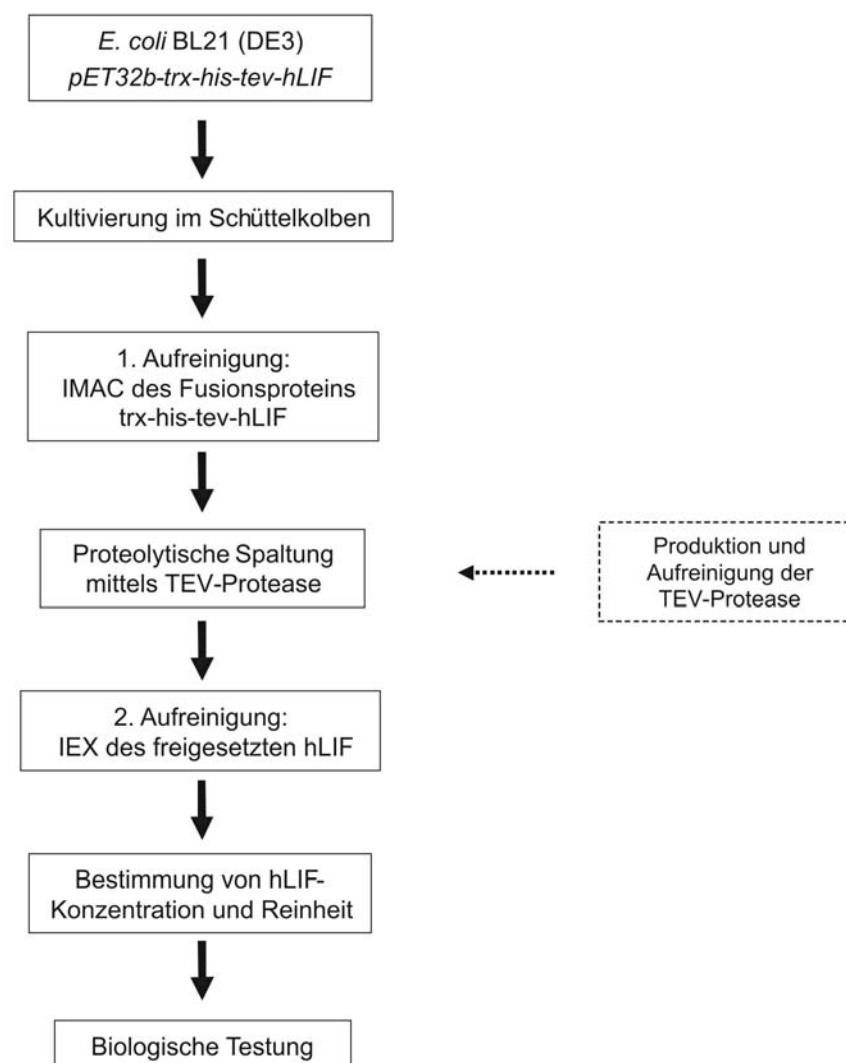
#### **3.2.8.4 Zusammenfassung des Produktionsprozesses der TEV-Protease**

Hintergrund der TEV-Protease Produktion war die Notwendigkeit eines hydrolytischen Enzyms, mit dem das Zielprotein hLIF aus einem Fusionsprotein spezifisch freigesetzt werden sollte (siehe Abschnitt 3.2). Hierfür wurde ein rekombinanter *E. coli* Rosetta(DE3) pLysS Wirtstamm verwendet, mit der die Protease exprimiert wurde. Über eine Metallchelataffinitätschromatographie konnte das Protein in einer 1-stufigen Aufreinigung erhalten werden. Das reine Protein erwies sich bei niedrigen Inkubationstemperaturen von 4°C als hoch aktiv und konnte effizient zur Spaltung des Fusionsproteins eingesetzt werden. Mit einer berechneten Ausbeute von 5,7 mg TEV-Protease aus 100 ml Kulturbrühe liegt die Leistung des *E. coli* Rosetta Stammes im Größenbereich des rekombinanten *E. coli* Stammes zur hFGF-2-Produktion (siehe Abschnitt 3.1.5).

Im Rahmen weiterer Zytokinproduktionsprozesse am Institut für Technische Chemie findet die TEV-Protease Verwendung bei der Spaltung von Fusionsproteinen, die aus Konstrukten wie dem pET32b-trx-his-tev-hLIF Expressionsvektor hervorgehen. So konnte das murine Zytokin SCF (*murine Stem Cell Factor*) mithilfe eines analogen Expressionsvektors pET32b-trx-his-tev-mSCF als lösliches Fusionsprotein exprimiert und aufgrund des Vorhandenseins der spezifischen TEV-Erkennungssequenz aus diesem freigesetzt werden<sup>132</sup>. Die Etablierung des Herstellungsprozesses der TEV-Protease leistet einen wichtigen Beitrag zur umfangreichen Produktion schlecht löslicher Zytokine in Form von Fusionsproteinen.

### 3.2.9 Zusammenfassung und Diskussion des Produktionsprozesses für hLIF

In der vorliegenden Arbeit wurde ein umfassender Produktions- und Aufreinigungsprozess für das Zytokin hLIF entwickelt. Ein Fließschema ist dazu in Abbildung 3.24 dargestellt. Nach Schüttelkolbenkultivierungen und erfolgter Expression in Form eines löslichen Fusionsproteins konnte dieses mittels IMAC aufgereinigt und proteolytisch gespalten werden. Für die Abspaltung, durch die das Zielprotein hLIF aus dem Fusionsprotein freigesetzt werden sollte, war die Notwendigkeit der Produktion eines proteolytisch aktiven Enzyms gegeben.



**Abbildung 3.24** Fließdiagramm zur hLIF Produktion. Dargestellt sind die wesentlichen Schritte des Herstellungsprozesses. Abkürzungen: IMAC: Metallchelataffinitätschromatographie, IEX: Ionenaustauschchromatographie, TEV: Tobacco Etch Virus Protease.

In diesem Zusammenhang wurde die hoch spezifische TEV-Protease eigens hergestellt und erfolgreich eingesetzt. Nach der Abspaltung des hLIF-Proteins aus dem Fusionsprotein konnte mithilfe einer Kationenaustauschchromatographie das hLIF als reines Protein erhalten werden. Die biologische Aktivität wurde daraufhin an murinen embryonalen sowie induzierten pluripotenten Stammzellen erfolgreich getestet. Mit einfachen Schüttelkolbenkultivierungen konnte mit diesem Prozess 400 µg reines hLIF Protein aus 100 ml Kulturbrühe gewonnen werden, mit dem 40 L Stammzellmedium hergestellt werden kann. Diese Ausbeute ist im Vergleich zum hFGF-2 deutlich geringer (siehe Abschnitt 3.1.5), jedoch muss die Komplexität des Fusionskonstruktes an dieser Stelle berücksichtigt werden. Außerdem konnte der Wirtstamm nicht zu vergleichbar hohen Zelldichten kultiviert werden, wie es mit dem hFGF-2- *E. coli* Stamm möglich war. Der in dieser Arbeit beschriebene Prozess zur Herstellung und Aufreinigung von hLIF konnte mehrfach reproduziert werden. Als „unbeständigste“ Größe innerhalb dieses Prozesses kann jedoch die Menge exprimierten löslichen Fusionsproteins betrachtet werden, welche somit den bedeutendsten Einfluss auf die Ausbeute des Endprodukts hatte. Eine Steigerung der hLIF-Ausbeute ließe sich eventuell mit Bioreaktorprozessen realisieren, indem eine kontrollierte niedrige Wachstumsrate, in Kombination mit einer geringeren Kultivierungstemperatur im Bereich von 20°C eine Expression löslichen Fusionsproteins erhöhen könnte. Der Einsatz von *E. coli* Stämmen (z.B. „Arctic Express“, Stratagene), die bei 4°C kultivierbar sind und rekombinante Chaperonsysteme besitzen, könnte in diesem Zusammenhang ebenfalls hilfreich sein.

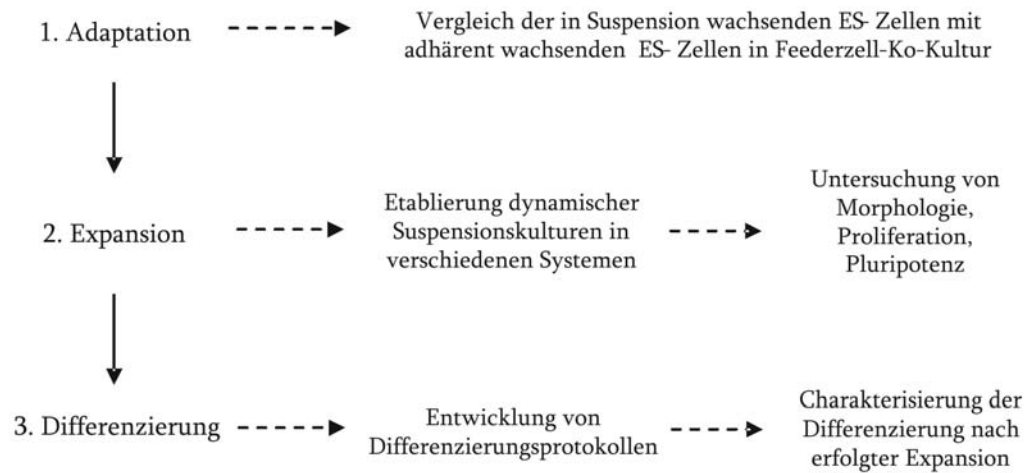
Weiterführende Arbeiten werden mit den hier ermittelten Kultivierungs- und Aufreinigungsbedingungen hLIF Produktionen in größerem Maßstab beinhalten und somit die Bereitstellung großer Mengen des Zytokins für Stammzellkultivierungen gewährleisten. Die Produktion der humanen Form des Zytokins wird dabei eine breite Anwendung des Proteins erlauben, wobei Kultivierungen humaner Stammzellen eingeschlossen werden können.

## 4 Entwicklung und Anwendung von Suspensionssystemen für die Kultivierung embryonaler Stammzellen

Aufgrund des Vermögens zu unlimitierter *in vitro* Vermehrung und ihrer Fähigkeit, zu allen Zelltypen des Körpers differenzieren zu können, finden embryonale Stammzellen (ES-Zellen) häufig Anwendung im Forschungsbereich der Regenerativen Medizin und des Tissue Engineerings. Hier werden sie in großer Menge und hoher Qualität benötigt. Embryonale Stammzellen werden üblicherweise als adhärente Kulturen geführt, wobei die ES-Zellen entweder in Ko-Kultur mit so genannten Feederzellen oder Feederzell-frei auf beschichteten Oberflächen im undifferenzierten Zustand gehalten werden (siehe Abschnitt 2.1.1.1). Adhärente Kulturen sind jedoch aufgrund der limitierten Oberflächenverfügbarkeit im Hinblick auf das *scale up* begrenzt. Hierfür einfacher zugänglich sind Kulturen, die unter Suspensionsbedingungen durchgeführt werden können.

Ziel dieser Arbeit war es, verschiedene Suspensionssysteme daraufhin zu testen, wie gut sie geeignet sind, ES-Zellen effizient in ihrem undifferenzierten Zustand zu expandieren. Zur Charakterisierung der Kultivierungssysteme wurde die murine ES-Zelllinie Brachyury (E14.1, 129/Ola) als Modellzelllinie verwendet. Um die ES-Zellen in suspendierten Systemen kultivieren zu können, war zunächst eine Anpassung der adhärent wachsenden Zellen an suspendierte Bedingungen erforderlich. Als Beurteilungskriterien sollten hierfür neben der Zellmorphologie das Proliferations- sowie Differenzierungspotential der Zellen untersucht werden. Damit einhergehend sollten Pluripotenz- bzw. Differenzierungsmarker auf transkriptionaler sowie auf Protein- und funktionaler Ebene nachgewiesen werden. Abbildung 4.1 zeigt eine Übersicht der Herangehensweise, mit der die Suspensionskulturen etabliert und charakterisiert werden sollten.

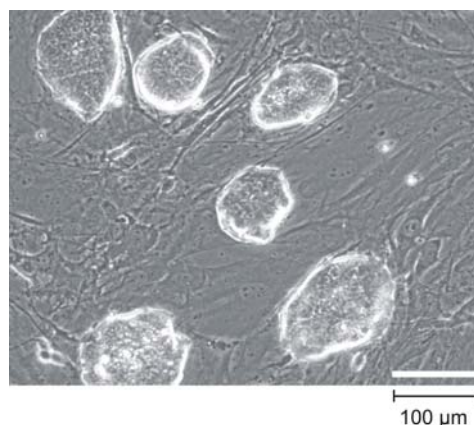




**Abbildung 4.1** Strategie zur Entwicklung und Anwendung von Suspensionskulturen embryonaler Stammzellen (ES-Zellen).

### 4.1 Adaptation von Brachyury ES-Zellen an suspendierte Bedingungen

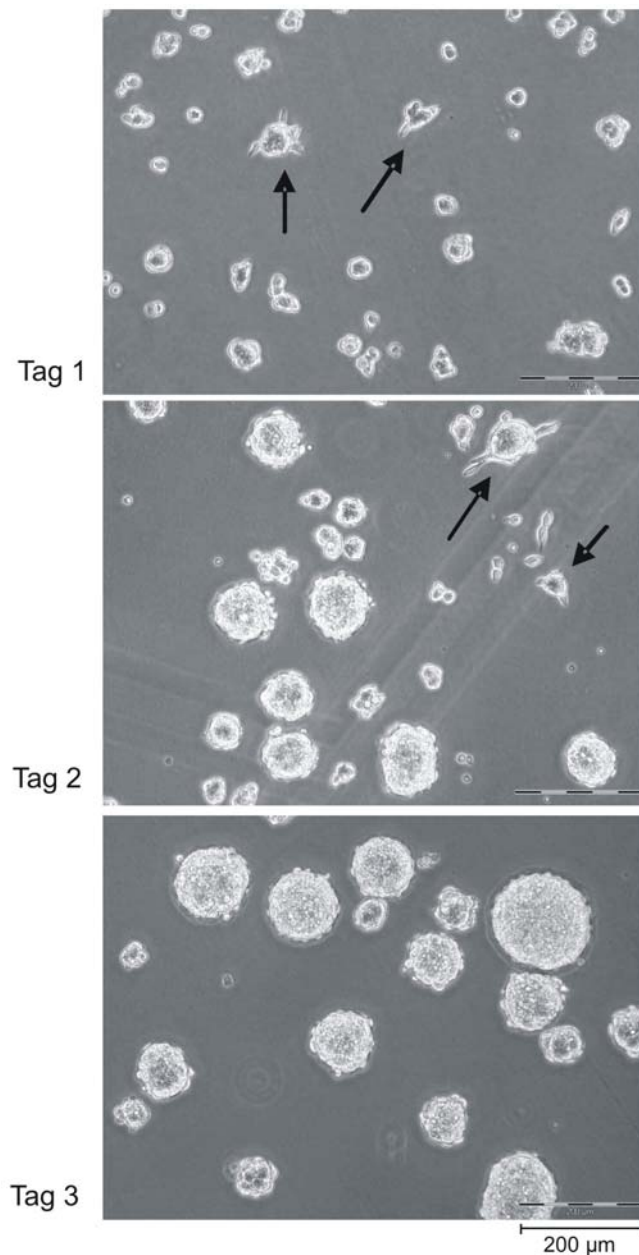
Die Brachyury ES-Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Ulrich Martin (Klinik für Herz-, Thorax-, Transplantations- und Gefäßchirurgie (HTTG), Medizinische Hochschule Hannover) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wachsen üblicherweise in Ko-Kultur mit einem Monolayer mitotisch inaktiver Feederzellen als adhären 2-dimensionale Kolonien (siehe Abbildung 4.2)<sup>133</sup>.



**Abbildung 4.2** Brachyury ES-Zellen in Feederzellen Ko-Kultur. Dargestellt sind sechs adhären wachsende Kolonien eingebettet in einen Zellrasen aus mitotisch inaktivierten Feederzellen (MEF, Murine Embryonale Fibroblasten)<sup>133</sup>.

Eine Beschichtung der Zellkulturplatten mit Gelatine fördert dabei das Adhärenieren der ES-Zellen. Am Ende jeder Passage werden die Kolonien mittels Kollagenase aus der Ko-Kultur abgelöst und anschließend mit Trypsin behandelt, um die Zellen zu vereinzeln. Diese werden wiederum in Zellkulturschalen mit einem frischen Feederzellenmonolayer in LIF haltigem Kulturmedium ausgesät, wo sie erneut Kolonien ausbilden.

Um eine Kultur suspendierter Brachyury Zellen zu erhalten, wurden trypsinierte, vereinzelt Zellen anstatt in Feederzellen-Ko-Kultur in unbeschichtete Petrischalen ausgesät.



**Abbildung 4.3** Lichtmikroskopische Aufnahmen von Brachyury ES-Zellen unter Suspensionsbedingungen. Zu Beginn der Kultur waren sowohl suspendierte Zellsphären als auch adhärenente Kolonien (siehe Pfeilmarkierungen) zu beobachten. Nach einem Transfer der Zellsuspension in eine neue Petrischale (an Tag 3) waren nur noch suspendierte Zellsphären in der Kultur enthalten.

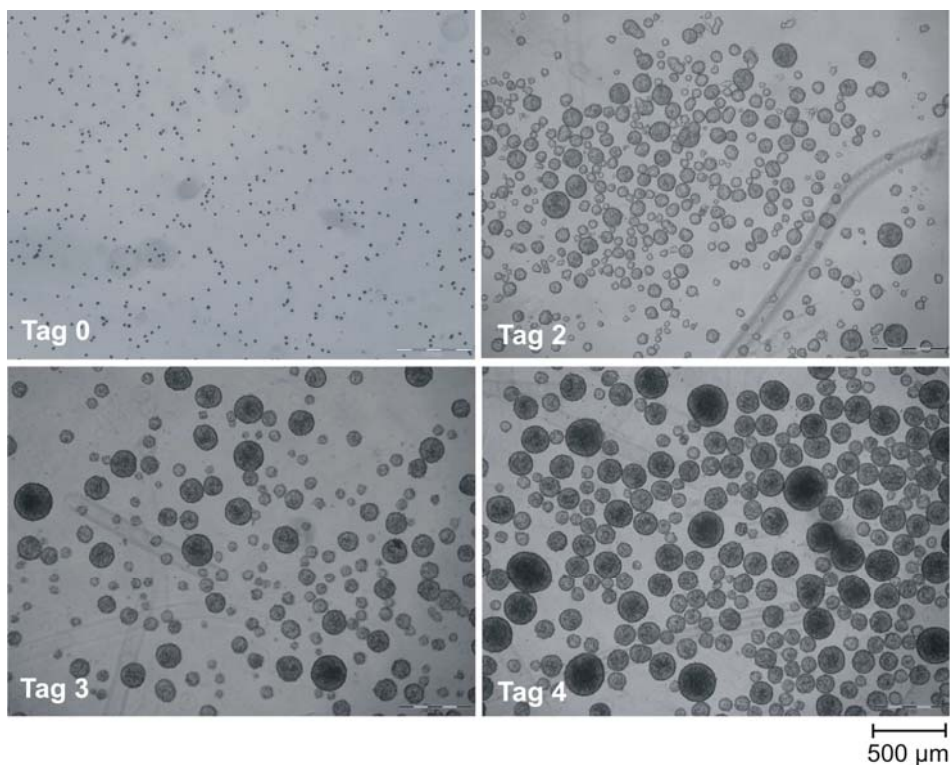
Um das Fehlen der Feederzellen zu kompensieren, erfolge die Kultivierung bei einer 10-fach höheren LIF-Konzentration (Endkonz. 10 ng / ml). Bereits am folgenden Tag waren in der Petrischale kleinere Zellsphären in Suspension zu erkennen (siehe Abbildung 4.3). Daneben wurden einige Kolonien adhärenter ES-Zellen beobachtet (siehe Pfeilmarkierungen in Abbildung 4.3, Tage 1 und 2). Nach drei bis vier Tagen haben sich die ES-Zellsphären deutlich vermehrt und vergrößert, während der Anteil der adhärierten Kolonien im Vergleich dazu etwas abgenommen hat. Dies ist vermutlich auf die „Adhärenz-hindernden“ Bedingungen (keine Gelatinebeschichtung, keine extrazelluläre Matrix von Feederzellen) zurückzuführen. Um eine Population rein suspendierter ES-Zellsphären zu erhalten, wurden diese vorsichtig aus der Petrischale entnommen wodurch sie von den adhärierten Kolonien getrennt wurden. Durch den sukzessiven Transfer der ausschließlich suspendierten ES-Zellen in neue Petrischalen während der folgenden Passagen konnten die suspendierten ES-Zellen folglich „selektiert“ werden.

## 4.2 Charakterisierung suspendierter Brachyury ES-Zellen

Die Zellpopulation wurde daraufhin unter Suspensionsbedingungen charakterisiert. Die Vitalität blieb über die gesamte Kultivierungsdauer bei ungefähr 95 %. Das spricht dafür, dass die Abwesenheit von Feederzellen sowie das Fehlen der Gelatinebeschichtung keinerlei negative Auswirkungen hatten. Die mittlere Verdopplungszeit  $t_D$  lag bei  $18,17 \pm 2,26$  h und die mittlere spezifische Wachstumsrate  $\mu$  bei  $0,038 \pm 0,004$  h<sup>-1</sup> (siehe Abschnitt 6.6.8.7), was in der Größenordnung von in der Literatur beschriebenen Werten für suspendierte murine ES-Zellen liegt<sup>50, 56</sup>.

### Morphologie

Darüber hinaus wurde die Morphologie der Zellsphären im Verlauf der Kulturpassagen dokumentiert. In Abbildung 4.4 sind lichtmikroskopische Aufnahmen von Brachyury ES-Zellen kurz nach dem Aussäen (Tag 0) sowie an darauf folgenden Kultivierungstagen dargestellt.



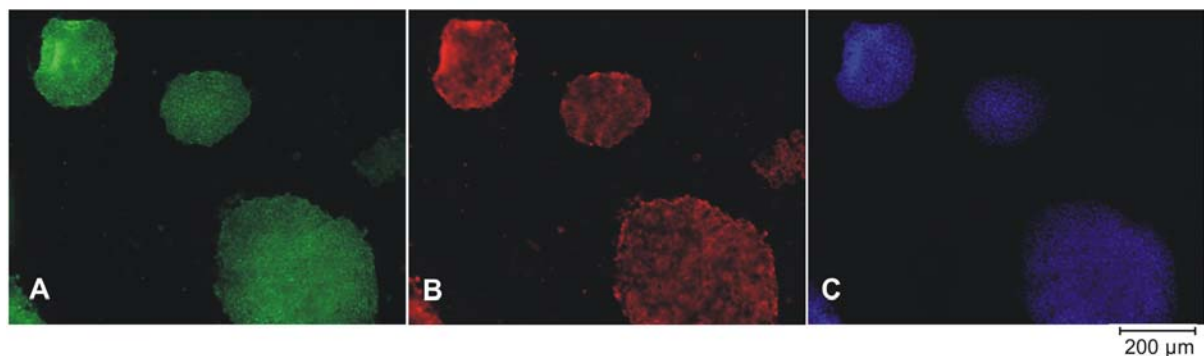
**Abbildung 4.4** Lichtmikroskopische Aufnahmen von Brachyury ES-Zellen in Suspensionskultur. Die Kulturen wurden an Tag 0 mit einer Einzelzellsuspension angeimpft. Im Laufe der Kultivierung wuchsen die Zellen in Form dreidimensionaler Sphären.

Es wird sichtbar, dass im Verlauf der Kultivierungszeit sowohl Anzahl als auch Größe der Sphären zugenommen haben. Nach drei bis vier Tagen in Kultur mussten die Zellen passagiert werden, da mit weiterhin zunehmender Größe die Sphären anfangen, untereinander zu aggregieren. Dies wirkte sich einerseits negativ auf die Vitalität der Zellen aus. Ferner war ein anschließendes Vereinzeln der Sphären mittels Trypsin nur dann effizient, wenn möglichst viele, im Idealfall alle Zellen, aus ihren Zellverbänden herausgelöst werden konnten und für eine neue Passage zur Verfügung standen. Dies war um so besser möglich, je kleiner die Sphären waren.

### Pluripotenz

Bei der Expansion von ES-Zellen ist es essentiell, dass die Pluripotenz unter den gegebenen Kultivierungsbedingungen erhalten bleibt. Zunächst wurde die Expression der beiden Pluripotenzmarker Oct-3/4 (*Octamer binding transcription factor-3/4*) und SSEA-1 (*Stage Specific Embryonic Antigen-1*) immunzytochemisch untersucht. Die immunzytochemische Färbung der Zellen wurde freundlicherweise von Frau Ingrid Schmidt-Richter (Klinik für HTTG) durchgeführt. Zum Nachweis von Oct-3/4 wurde ein Cy2- markierter monoklonaler Antikörper verwendet, für die Detektion von SSEA-1 ein monoklonaler Cy3- markierter Antikörper.

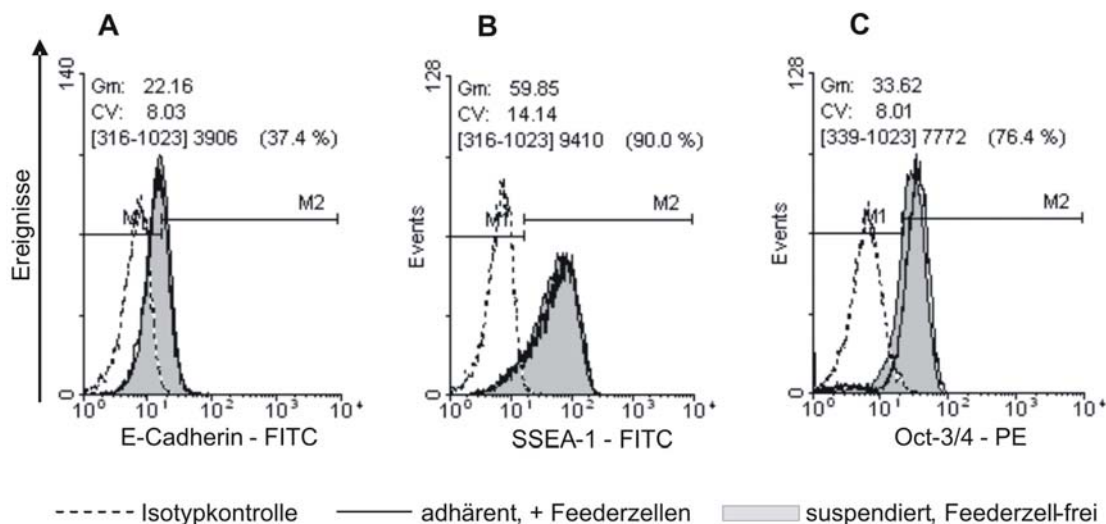
In Abbildung 4.5 sind fixierte, gefärbte Sphären nach sieben Passagen in Suspensionskultur zu sehen. Die Expression beider Marker Oct-3/4 (Abbildung 4.5 A) und SSEA-1 (Abbildung 4.5 B) konnte qualitativ nachgewiesen werden. Zur Visualisierung der Zellkerne wurde eine Dapi-Färbung durchgeführt (Abbildung 4.5 C).



**Abbildung 4.5** Immunzytochemische Färbung von Brachyury ES-Zellen in Suspensionskultur. A: Oct-3/4 Expression visualisiert über die Fluoreszenz von Cy2, B: SSEA-1 Expression visualisiert über die Fluoreszenz von Cy3, C: Visualisierung der Zellkerne mittels Dapi.

Zusätzlich wurde die Pluripotenz quantitativ auf Einzelzellebene mittels durchflusszytometrischer Analyse bestimmt. Hierbei erfolge ein direkter Vergleich der Markerexpression von Brachyury ES-Zellen aus adhärenter Feederzell-Ko-Kultur gegenüber einer suspendierten, Feederzell-freien Kultur von Brachyury ES-Zellen. Neben Oct-3/4 und SSEA-1 wurde bei dieser Analyse zusätzlich das Oberflächenprotein E-Cadherin, ein weiterer Marker für Pluripotenz, untersucht. Hierfür wurden die Zellen mit entsprechenden monoklonalen Antikörpern und deren Isotyp-Kontrollen inkubiert und anschließend vermessen. Positive Färbung wurde definiert als die Emission eines Fluoreszenzsignals, das größer war als das Signal der Zellen, die mit Isotypkontroll-Antikörpern inkubiert worden waren (das detaillierte Protokoll befindet sich in Abschnitt 6.6.11).

In Abbildung 4.6 sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse dargestellt. Eine weitgehende Überlappung aller Histogramme zeigt, dass die Expression der Pluripotenz-assoziierten Marker identisch bei adhären sowie suspendiert kultivierten ES-Zellen war. Die Adaptation an suspendierte Bedingungen führte demnach zu keiner signifikant veränderten Expression der drei Markerproteine.

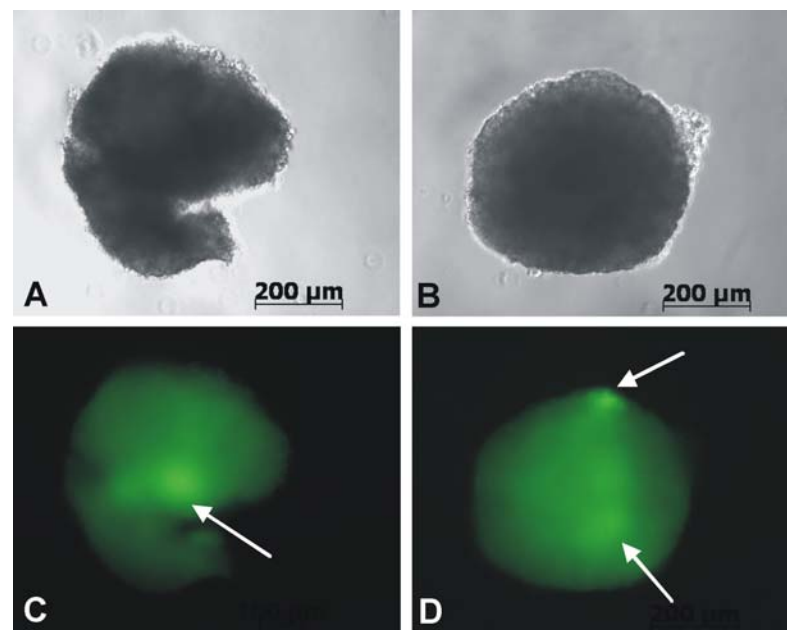


**Abbildung 4.6** Vergleich der Pluripotenzmarkerexpression von adhären, Feederzell-haltig sowie suspendiert und Feederzell-frei kultivierter Brachyury ES-Zellen. Dargestellt sind Histogramm-Overlays der jeweiligen E-Cadherin (A), SSEA-1 (B) und Oct-3/4 (C) Expressionslevel. PE: Phycoerythrin, FITC: Fluoresceinisothiocyanat.

### Differenzierungspotential

Neben dem Erhalt der Pluripotenz wurde überprüft, ob die Adaptation einen Einfluss auf das Differenzierungspotential der Zellen hatte. Mit dem Entfernen des Zytokins LIF aus dem Kulturmedium kann bei murinen embryonalen Stammzellen eine spontane Differenzierung eingeleitet werden (siehe Abschnitt 2.1.3). Die Differenzierung wird in diesem Fall als spontan bezeichnet, da keinerlei Signalmoleküle eingesetzt werden, die die Differenzierung entlang einer bestimmten Linie fördern.

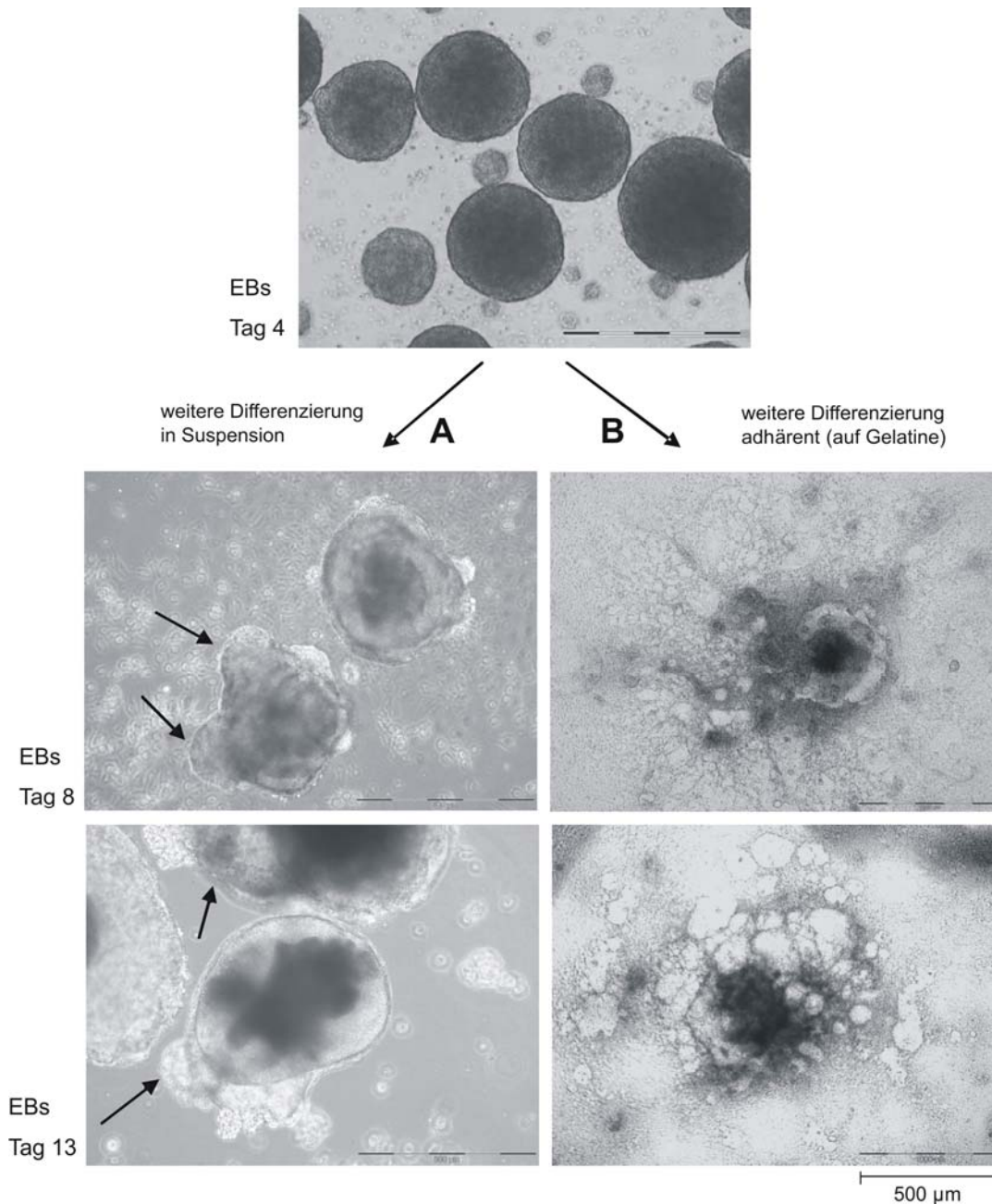
In Anlehnung an ein etabliertes Protokoll zur Bildung so genannter *Embryoid Bodies* (EBs) wurden Brachyury ES-Zellen in hängenden Tropfen in Differenzierungsmedium ausgesät (das detaillierte Protokoll ist in Abschnitt 6.6.10.1 zu finden). Da die Zelllinie Brachyury einen GFP-Reporter für das mes-endodermale Markergen *Brachyury* enthält<sup>134</sup>, kann eine beginnende Differenzierung mit Bildung mes-endodermaler Vorläuferzellen über eine grüne Fluoreszenz visualisiert werden. *Embryoid Bodies* von Brachyury ES-Zellen, die adhärent und Feederzell-haltig sowie von Zellen, die suspendiert kultiviert worden waren, wurden an Tag 5 der Differenzierung auf das Vorhandensein grüner Fluoreszenz mikroskopisch untersucht.



**Abbildung 4.7** *Embryoid Bodies* (an Tag 5) generiert aus Brachyury ES-Zellen aus Feederzell-haltiger, adhärenter (A, C) sowie aus Suspensionskultur (B, D). A und B: Lichtmikroskopische Aufnahmen, C und D: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zur Visualisierung der GFP-Fluoreszenz.



Wie der Abbildung 4.7 zu entnehmen ist, konnte in beiden Fällen eine grüne Fluoreszenz in Teilbereichen der EBs beobachtet werden. Die fluoreszierenden Bereiche (siehe Pfeilmarkierungen) weisen auf eine Differenzierung in mes-endodermale Vorläuferzellen hin. Entwickelten sich die EBs weiter, konnten Cystenbildungen (siehe Pfeilmarkierungen in Abbildung 4.8 A) beobachtet werden, die charakteristisch für suspendierte EBs im fortgeschrittenen Stadium sind.



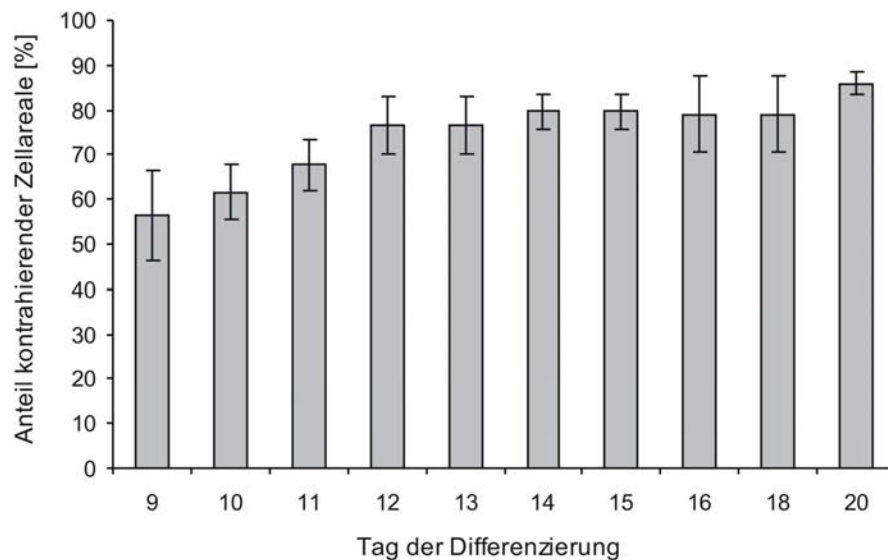
**Abbildung 4.8** Lichtmikroskopische Aufnahmen von *Embryoid Bodies* im Verlauf der Differenzierung. A) EBs bildeten typische blasige Strukturen aus (Cysten, siehe Pfeilmarkierungen), wenn sie weiterhin in Suspension kultiviert wurden. B) Adhärenz wachsende, differenzierende EBs zeigten ebenfalls eine typische vom ausplattierten Zentrum her ausgehende Ausbreitung.



Auch zeigten EBs, die ab Tag 4 der Differenzierung auf Gelatine ausplattiert und von dort an adhärent weiter kultiviert wurden, die typische Morphologie sich ausbreitender, differenzierender Zellbereiche (Abbildung 4.8 B).

Des Weiteren wurde das kardiale Differenzierungspotential der in Suspension kultivierten Brachyury ES-Zellen untersucht. Hierfür wurden *Embryoid Bodies* an Tag 4 der Differenzierung auf Gelatine ausplattiert und in Differenzierungsmedium über weitere 17 Tage kultiviert. Die Effizienz der kardialen Differenzierung wurde als Anteil kontrahierender Zellareale der EBs im zeitlichen Verlauf bestimmt (siehe Abbildung 4.9).

In der Differenzierungskultur konnte eine zeitliche Zunahme des Anteils kontrahierender Zellareale beobachtet werden. Wiesen an Tag 9 der Differenzierung  $56,2 \% \pm 10,3 \%$  der *Embryoid Bodies* kontrahierende Zellareale auf, konnte an Tag 20 ein maximaler Anteil von  $86 \pm 2,3 \%$  der EBs als kontrahierend bestimmt werden. Dieser Wert liegt in der Größenordnung für diese Zelllinie in üblicher Feederzell-Ko-Kultur (mündliche Information aus der Klinik für HTTG).



**Abbildung 4.9** Entwicklung von *Embryoid Bodies* in Differenzierungskultur mit der Zeit. Dargestellt ist der Anteil kontrahierender Zellareale von ausplattierten *Embryoid Bodies*, die aus in Suspension expandierter Zellsphären hervorgegangen sind. Angegeben sind Mittelwerte aus sechs Werten  $\pm$  Standardfehler.

**Fazit:** Die murine ES-Zelllinie Brachyury ließ sich von adhärenenten, Feederzell-abhängigen Kulturen auf ein Wachstum in Feederzell-freien Suspensionsbedingungen adaptieren. Es konnte eine proliferierende Population an ES-Zellen erhalten werden, die ein Wachstum in Form dreidimensionaler suspendierter Zellsphären aufzeigte. Dabei konnte eine unveränderte Expression der Pluripotenz-assoziierten Markerproteine Oct-3/4, SSEA-1 und E-Cadherin beobachtet werden. Die Zellen waren nach wie vor uneingeschränkt fähig, *Embryoid Bodies* zu bilden und differenzierten spontan zu funktionalen Kardiomyozyten. Folglich wurden keine signifikanten Unterschiede zu den Feederzell-abhängigen Brachyury ES-Zellen beobachtet. Es sei darauf hingewiesen, dass diese Eigenschaften auch nach zahlreichen Passagen (> 25) sowie nach Kryokonservierungs- und Revitalisierungszyklen in Suspensionskultur erhalten blieben. Der Vorteil dieser alternativen Kultivierungsmethode liegt neben dem Verzicht auf biologisch variable Feederzellen und der arbeitsintensiven Ko-Kultur in der Tatsache begründet, dass Suspensionskulturen im Gegensatz zu adhärenent geführten Kulturen einfacher für ein *scale up* des Kultivierungsmaßstabes zugänglich sind. Die Adaptation der ES-Zellen an ein Wachstum in statischer Suspension in Petrischalen schaffte die Grundlage für dynamische Suspensionskultivierungen, auf die im folgenden Abschnitt ausführlich eingegangen wird.

### 4.3 Dynamische Suspensionskulturen

In dieser Arbeit werden Suspensionskulturen als „dynamisch“ bezeichnet, sobald die suspendierten Zellen durch äußere Einflüsse wie Rühren oder Schütteln in Bewegung (Dynamik) versetzt werden. Dynamische Suspensionskulturen sind in mehreren Punkten im Vergleich zu statischen Petrischalenkulturen als vorteilhaft zu betrachten. Aufgrund einer Durchmischung des Kulturmediums werden homogene Bedingungen geschaffen und Diffusionslimitierungen minimiert. Im Hinblick auf ein *scale up* des Kultivierungsmaßstabs sind dynamische Systeme ebenfalls statischen Systemen vorzuziehen.

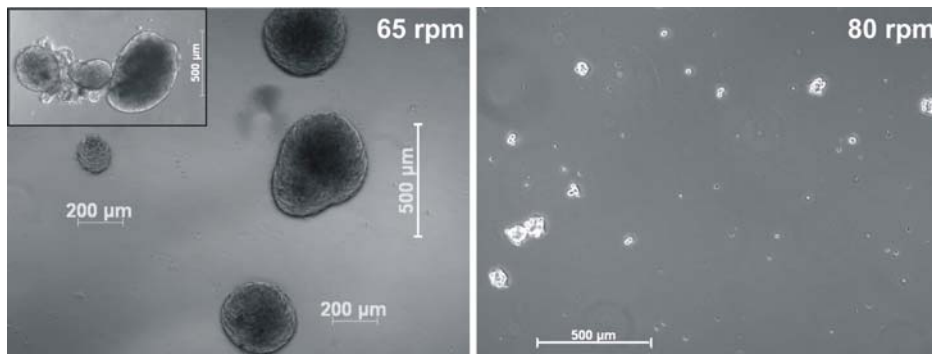
Die Durchführung dynamischer Kultivierungen stellt jedoch bestimmte Anforderungen an das System. Einerseits bedarf es einer gewissen Durchmischung, um Nährstoff- und Sauerstofflimitierungen der Zellen zu reduzieren. Demgegenüber darf der durch die Durchmischung entstehende Scherstress nicht zu groß sein, um physikalische Zellschädigungen auszuschließen.

Insbesondere bei ES-Zellen, die in Form von Zellsphären wachsen, ist dies ein kritischer Punkt. Im folgenden Teil der Arbeit sollen Einflüsse der Rührgeschwindigkeit, der Geometrie des Rührorgans sowie der Art der Durchmischung auf die Morphologie von ES-Zellsphären untersucht werden. Hierzu werden verschiedene gerührte und geschüttelte Kultivierungssysteme vorgestellt und getestet.

#### 4.3.1 *Morphologie von Brachyury ES-Zellen in dynamischer Suspensionskultur*

##### **Kultivierung in gerührten Systemen**

Um das Verhalten von Zellsphären unter gerührten Bedingungen zu untersuchen, wurden zunächst kommerziell erhältliche Spinnerflaschen mit Rührpendeln eingesetzt. Dazu wurden Kulturen mit einer Einzelzellsuspension von je  $2 \cdot 10^4$  Zellen / ml angeimpft. Die Kultivierungen wurden bei zwei verschiedenen Rührgeschwindigkeiten (65 rpm und 80 rpm, *revolutions per minute*) durchgeführt.

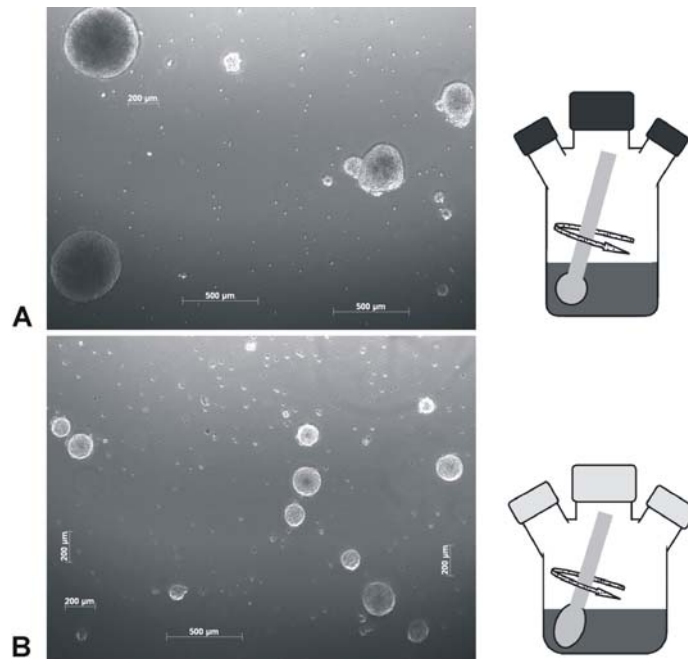


**Abbildung 4.10** Lichtmikroskopische Aufnahmen von Zellsphären 24 h nach dem Animpfen von Suspensionskulturen in Spinnerflaschen mit Einzelzellen. Oben rechts im Bild ist jeweils die Rührgeschwindigkeit des Pendels angegeben.

Bereits nach 24 h der Kultivierung wurden in Abhängigkeit der Rührgeschwindigkeit deutliche Unterschiede in der Morphologie und Größe der Sphären sichtbar (siehe Abbildung 4.10). Die enorme Größe der Sphären bei 65 rpm kann nach 24 h in Kultur nicht durch reine Zellteilung erklärt werden, sondern ist auf ein Aggregieren von Einzelzellen sowie sich bildenden Sphären zurückzuführen.

Um weiterhin den Einfluss der Art des Spinnersystems auf die Sphärenbildung zu untersuchen, wurden Spinnerflaschen mit unterschiedlichen Pendeln getestet. Abbildung 4.11 A und B zeigt Sphären, die in diesen Systemen erzeugt wurden.

In Spinnerflasche A (Hersteller Techne) wurden im Gegensatz zur Spinnerflasche B (Hersteller Integra Biosciences) größere und teilweise untereinander aggregierende Sphären beobachtet. Dieser Unterschied war bemerkenswert, da sich die beiden Spinnerflaschen marginal voneinander unterscheiden. Beide Systeme waren mit Rührpendeln ausgestattet, diese variierten lediglich in der Geometrie des Rührerkopfes (A kugelförmig, B olivenförmig). Zudem wird durch den etwas größeren Durchmesser der Spinnerflasche B das Oberfläche/Volumen-Verhältnis im Vergleich zur Spinnerflasche A größer.



**Abbildung 4.11** Lichtmikroskopische Aufnahmen von Sphären 24 h nach dem Animpfen zweier unterschiedlicher Spinnerflaschenkulturen mit Einzelzellen. Kultur A wurde in einer 125 ml Spinnerflasche des Herstellers Techne, Kultur B in einer 125 ml Spinnerflasche des Herstellers Integra Biosciences, bei jeweils 80 rpm, durchgeführt.

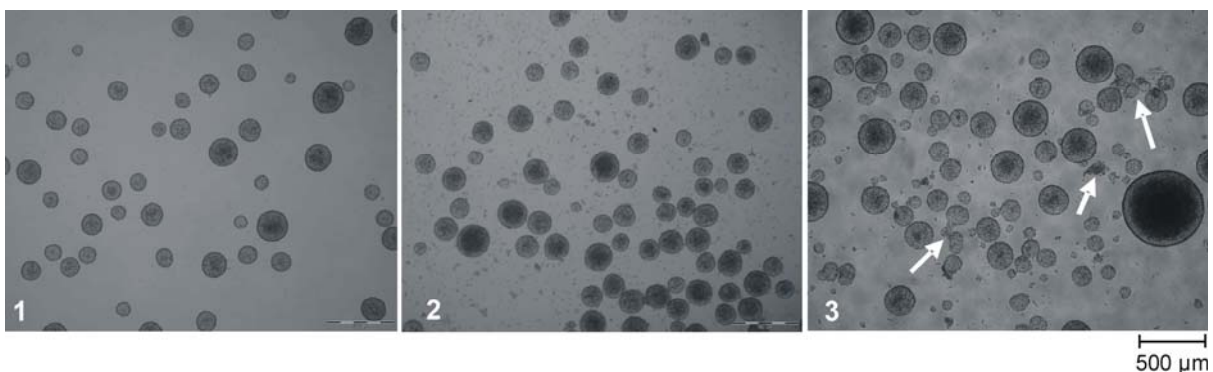
Angeichts des starken Einflusses der Rührergeometrie auf die Bildung von ES-Zellsphären wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Spinnerflasche entwickelt, die es erlaubt, durch einen einfachen Austausch des Rührorgans verschiedene Strömungsverhältnisse zu untersuchen. Im Gegensatz zu den kommerziell erhältlichen ist bei dieser Spinnerflasche anstelle eines Pendelrührers eine vertikale Rührerachse vorhanden (siehe Abbildung 4.12 A). Durch einen Einschnitt in der Mitte kann das Kulturgefäß geöffnet werden (siehe Abbildung 4.12 B) und aufgrund eines universellen Adapters, der in den oberen mittleren Deckel der Flasche eingebaut wurde, können Achsen mit verschiedenen Rührertypen eingesetzt werden (Abbildung 4.12 C). Die Spinnerflasche wird so zu einem variabel einsetzbaren System.

In jeden Rührer ist ein Stabmagnet integriert, der von einem unterschiedlich geformtem „Glasmantel“ umgeben ist. Rührertyp 1 bildet ein Kreuz aus zwei gleichen Glasstäben, während der zweite Rührertyp aus einem Stab und zwei gegeneinander geschwungenen Paddeln besteht. Rührertyp 3 stellt einen glasumhüllten Stabmagneten dar, der wie die anderen Typen senkrecht zur Rührerachse angeordnet ist (siehe Abbildung 4.12 C).



**Abbildung 4.12** Spinnerflasche TCI. A: Spinnerflasche mit vertikal eingebauter Rührerachse. B: geöffnete Spinnerflasche. C: drei verschiedene Rührertypen 1-3. Die Rührerdurchmesser wurden jeweils auf die Hälfte des Spinnerflaschendurchmessers angepasst.

Analog zu den vorherigen Versuchen wurde die Morphologie von Zellsphären in Abhängigkeit der eingesetzten Rührertypen untersucht. Bei Rührergeschwindigkeiten von 80 rpm wurden in allen Fällen starke Verklumpungen beobachtet. Wurde hingegen die Drehzahl auf 100 rpm erhöht, konnten bessere Ergebnisse erzielt werden. In Abbildung 4.13 sind ES-Zellsphären dargestellt, die in Spinnerflaschen mit Rührertypen 1, 2 und 3 kultiviert worden sind. Die relativ hohe Rührergeschwindigkeit von 100 rpm hat sich für die Rührertypen 1 und 2 als geeignet in Bezug auf Sphärengröße und Größenverteilung herausgestellt.



**Abbildung 4.13** Lichtmikroskopische Aufnahmen von ES-Zellsphären, die in Spinnerflaschen mit unterschiedlichen Rührertypen 1, 2 und 3 bei jeweils 100 rpm kultiviert wurden. Die Pfeile markieren beschädigte Sphären. Bilder wurden an Tag 3 der Kultur aufgenommen.

In der Spinnerflasche mit Rührertyp 3 waren weiterhin große und teilweise untereinander aggregierte Sphären sichtbar, die vermutlich aufgrund von unzureichender Durchmischung hervorgegangen sind. Gleichzeitig wurden vermehrt beschädigte Sphären (siehe Pfeilmarkierungen) beobachtet, was wiederum zu starke lokale Scherkräfte vermuten lässt.

Die unterschiedliche Rührergeometrie führt bei gleichen Rührgeschwindigkeiten zu einer unterschiedlichen Durchmischung, die offenbar einen Einfluss auf die Bildung der Sphären hat. Eine weitergehende rheologische Untersuchung der Durchmischung könnte an dieser Stelle zur Klärung dieses Phänomens beitragen.

##### **Kultivierung in orbital geschüttelten Kulturgefäßen**

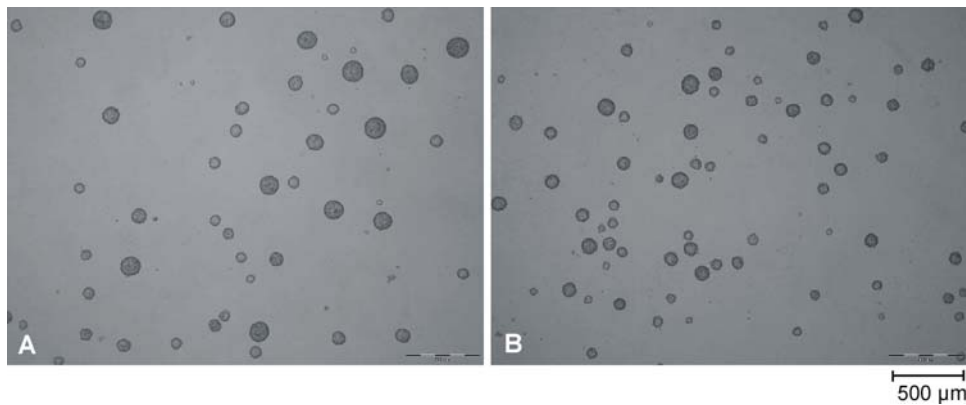
Alternativ zum Einsatz interner Rührorgane können dynamische Suspensionskulturen über eine von außen herbeigeführte Bewegung des gesamten Kulturgefäßes realisiert werden. Zu dieser Art von geschüttelten Kultivierungssystemen gehören so genannte CultiFlasks (CultiFlask 50 Tubes, Sartorius-Stedim Biotech) und Erlenmeyerkolben (z.B. von VWR International GmbH) die als „Einweg-Kulturgefäße“ (*disposable*) erhältlich sind (siehe Abbildung 4.14).



**Abbildung 4.14** A) Orbital geschüttelte CultiFlask 50 Tubes (Sartorius-Stedim Biotech), B) Erlenmeyerkolben (VWR International GmbH).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese Systeme für Kulturen embryonaler Stammzellen in Suspension verwendet. In einem ersten Schritt wurde die Eignung dieser Systeme anhand der Morphologie der Zellsphären qualitativ beurteilt.

In Abbildung 4.15 sind Brachyury Zellsphären dargestellt, die in CultiFlasks (A) und Erlenmeyerkolben (B) kultiviert wurden. Nach der Ermittlung einer geeigneten Schüttelgeschwindigkeit von 110 rpm für Erlenmeyerkolben und 270 rpm für CultiFlask 50 Tubes konnten beide Systeme für die Expansion von Brachyury ES-Zellen in Form von Zellsphären verwendet werden.



**Abbildung 4.15** Lichtmikroskopische Aufnahmen von ES-Zellsphären, die in (A) CultiFlask 50 Tubes bei 270 rpm und in (B) Erlenmeyerkolben bei 110 rpm kultiviert wurden. Die Aufnahmen zeigen Sphären an Tag 3 der Kultur.

**Fazit:** Es konnte gezeigt werden, dass Brachyury ES-Zellen unter dynamischen Suspensionsbedingungen kultiviert und vermehrt werden können. Dabei kann eine Reihe verschiedener Kultivierungssysteme wie Spinnerflaschen, Erlenmeyerkolben und CultiFlasks eingesetzt werden. In Abhängigkeit von der Art des Rührorgans bzw. Kultivierungssystems muss jeweils die optimale Rühr- bzw. Schüttelgeschwindigkeit ermittelt werden. Wie demonstriert, haben die Strömungs- oder Durchmischungsverhältnisse innerhalb von gerührten und geschüttelten Kultivierungssystemen einen Einfluss auf die Generierung von ES-Zellsphären. Von daher ist die Wahl eines schonenden dynamischen Systems, das gleichzeitig für eine ausreichende Homogenisierung sorgt, bei der Suspensionskultivierung embryonaler Stammzellen von großer Bedeutung.

Das Zellwachstum wurde bisher qualitativ anhand der Sphärenmorphologie beurteilt. Anhand dieser konnte bereits vermutet werden, dass die Art des Kultivierungssystems auch einen Einfluss auf die Proliferation der ES-Zellen haben kann. Diese wird im folgenden Abschnitt näher beschrieben.








### 4.3.2 *Proliferation und Sphärengöße von Brachyury ES-Zellen in dynamischer Suspensionskultur*

Die Proliferation undifferenzierter, suspendierter ES-Zellen wurde anhand von ausgewählten Systemen untersucht. In Tabelle 3 sind die verwendeten Kultivierungssysteme, die jeweiligen Arbeitsvolumina sowie Rühr- bzw. Schüttelgeschwindigkeiten zusammengefasst.

Es wurden zwei unterschiedliche Spinnerflaschen mit orbital geschüttelten Systemen verglichen. Spinnerflasche 1 war mit einem Rührpendel, Spinnerflasche 2 mit einer vertikalen Rührerachse (des Typs 1) ausgestattet. Erlenmeyerkolben und CultiFlask 50 Tubes ohne interne Rührorgane wurden in die Untersuchung eingeschlossen. Zusätzlich wurde das Wachstum der Brachyury ES-Zellen in statischer Petrischalenkultur untersucht.

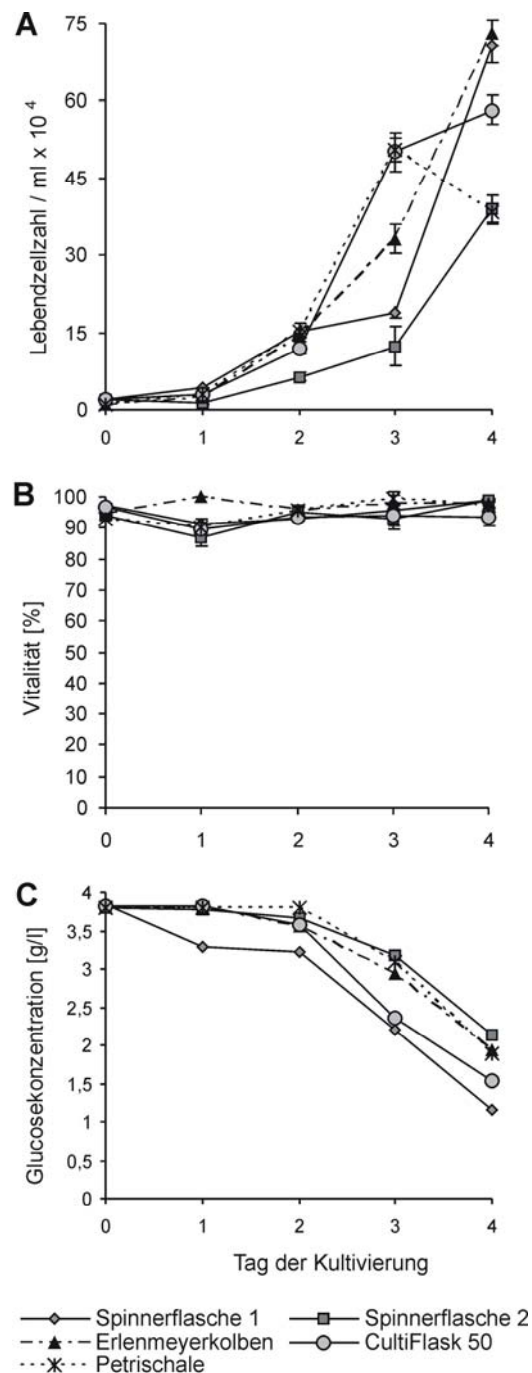
**Tabelle 3** Verwendete Suspensionskultivierungssysteme unter Angabe ihrer spezifischen Kultivierungsparameter.

Reaktor - Bezeichnung	Spinnerflasche 1 (Integra Biosciences)	Spinnerflasche 2 (TCI)	Erlenmeyer- kolben (VWR Internat.)	CultiFlask 50 (Sartorius- Stedim Biotech)	Petrischale (Greiner Bio One)
Arbeits- volumen [ml]	50	50	25	15	10
Rühr- bzw. Schüttel- geschwindigkeit [rpm]	100	100	110	270	-
Kultivierungs- system					

Hierzu wurden die Kultivierungssysteme mit einer Einzelzellsuspension von je  $2 \cdot 10^4$  Zellen/ml angeimpft und bei der zuvor ermittelten optimalen Rühr- bzw. Schüttelgeschwindigkeit (siehe Tabelle 3) im Satzbetrieb durchgeführt. Die Probenahme zur Bestimmung der Zelldichte und Vitalität erfolgte einmal täglich. Über die Messung von Glucose im Kulturmedium wurde zudem die metabolische Aktivität der Zellen verfolgt.

Abbildung 4.16 A zeigt repräsentative Wachstumskurven von Brachyury ES-Zellen unter Verwendung der oben genannten Kultivierungssysteme im Vergleich. Während die Zellen in den orbital geschüttelten Gefäßen und in der Spinnerflasche 1 am besten proliferierten, wies die Kultur in der Spinnerflasche 2 ein deutlich geringeres Wachstum auf. Das Wachstum unter statischen Bedingungen (Petrischale) war in den ersten drei Kultivierungstagen mit der CultiFlask Kultur vergleichbar. Am vierten Tag der Kultur begannen die Sphären

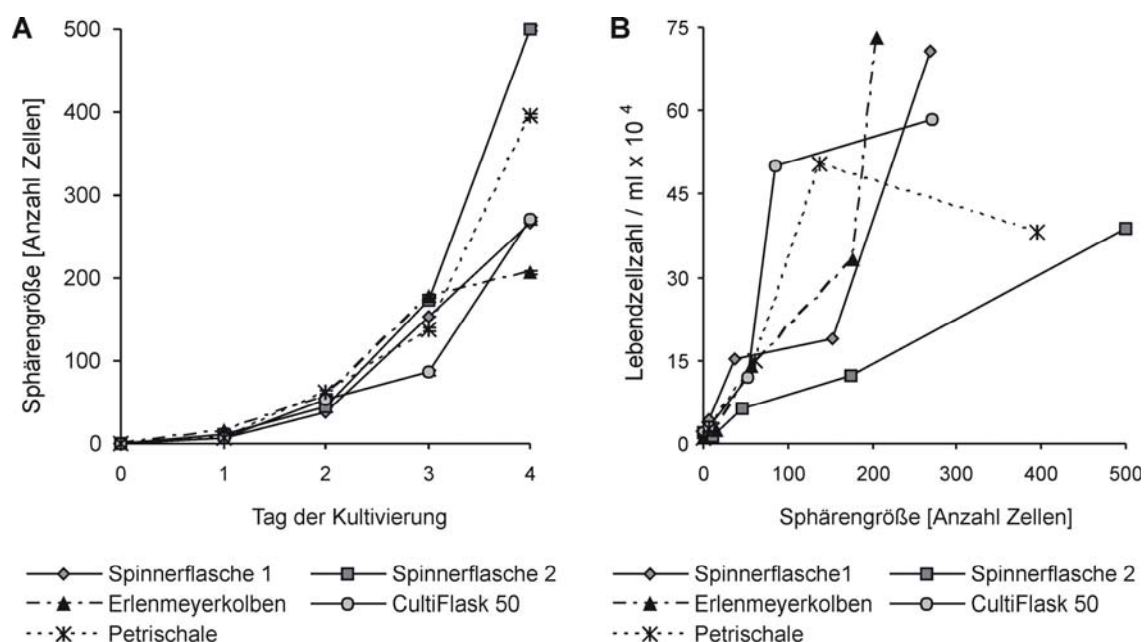
untereinander zu aggregieren, was letztlich zu verringerten Zellzahlen führte. Hingegen konnten keine signifikanten Unterschiede in der Vitalität der Zellen beobachtet werden, die mittels Trypanblau-Ausschluss bestimmt wurde (siehe Abbildung 3.13 B). Ferner war die metabolische Aktivität der Zellen, hier angegeben als resultierende Glukosekonzentration im Medium, in allen Systemen im wesentlichen vergleichbar (Abbildung 4.16 C).



**Abbildung 4.16** Charakterisierung von Brachyury ES-Zellen kultiviert in den fünf Systemen Spinnerflasche 1, Spinnerflasche 2, Erlenmeyerkolben, CultiFlask 50, Petrischale. A: Zelldichte angegeben als Lebendzellzahl / ml. Angegeben sind Mittelwerte aus vier Werten  $\pm$  Standardfehler. B: Vitalität, C: Glukosekonzentration im Kulturmedium als Maß für die metabolische Aktivität. Angegeben sind jeweils die Werte einer Einfachbestimmung.

Hinsichtlich der Proliferation haben sich die orbital geschüttelten Kulturgefäße sowie die Spinnerflasche 1 als effizienteste Systeme zur Expansion der ES-Zellen herausgestellt. Da die Kulturen keine signifikanten Unterschiede in der Vitalität und der metabolischen Aktivität zeigten, kann davon ausgegangen werden, dass die Unterschiede in der Proliferation nicht auf nekrotischen Zelltod oder physikalische Sphärenscheidungen zurück zu führen waren. Mithilfe einer ausführlichen Analyse mittels eines bildbearbeitenden Algorithmus wurden das Volumen sowie die Anzahl von Zellen pro Sphäre bestimmt. Der Algorithmus wurde von Herrn Dr. Patrick Lindner vom Institut für Technische Chemie entwickelt.

In Abbildung 4.17 A ist die mittlere Sphärengröße (angegeben als Anzahl enthaltener Zellen) im Verlauf der Kultivierungen gezeigt. Beginnend mit dem dritten Tag der Kultivierung konnten bereits leichte Unterschiede in der mittleren Sphärengröße beobachtet werden. Am Tag 4 der Kultivierung waren diese deutlich stärker ausgeprägt. Sphären aus der Kultur in der Spinnerflasche 2 enthielten im Mittel 501 Zellen und Sphären aus der Petrischalenkultur bestanden aus durchschnittlich 398 Zellen (siehe Abbildung 4.17 A). Sphären, die aus Kultivierungen im Erlenmeyerkolben, CultiFlask und der Spinnerflasche 1 hervorgegangen sind, beinhalteten deutlich weniger Zellen (206, 268 und 272 Zellen; die hier angegebenen Daten wurden aus jeweils einer Kultivierung pro untersuchtem System erhalten).



**Abbildung 4.17** Die mittlere Größe von Zellsphären generiert in den fünf Systemen Spinnerflasche 1, Spinnerflasche 2, Erlenmeyerkolben, CultiFlask 50, Petrischale ist gezeigt. A: Die mittlere Sphärengröße ist in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer dargestellt. B: Die Sphärengröße ist gegen die Lebendzellzahl aufgetragen. Angegeben sind Mittelwerte aus mindestens 30 Sphären.

Dies stand im Gegensatz zur ermittelten Gesamtzellzahl, wie in Abbildung 4.16 A zu sehen ist. Kultivierungen im Erlenmeyerkolben, CultiFlask und in der Spinnerflasche 1 resultierten in der größten Zellzunahme, während die Zelldichten in der Spinnerflasche 2 und in der Petrischale deutlich niedriger waren. Diese Beobachtung führt zu der Schlussfolgerung, dass große Sphären vornehmlich aufgrund der vorherrschenden Strömungsverhältnisse generiert worden waren. Diese führten dazu, dass Einzelzellen und sich bildende Sphären stark verklumpten und resultierte letztlich in einer verringerten Proliferation der Zellen innerhalb großer Sphären. Diese Tatsache wird in Abbildung 4.17 B illustriert, in der die Lebendzellzahl / ml gegen die mittlere Sphärengröße aufgetragen ist. Je größer die Sphärengröße, desto geringer war die Zelldichte in der entsprechenden Kultur. Dieses Phänomen wird hier an Tag 4 der Kultivierung am deutlichsten. Dieser Zusammenhang wurde in allen durchgeführten Kultivierungen festgestellt. Wurden bereits am ersten Tag der Kultur große Sphären beobachtet, konnte im weiteren Verlauf nur eine schwache Zunahme der Zellzahl bestimmt werden. Die Abnahme der Proliferation von Zellen innerhalb großer Sphären ist wahrscheinlich auf diffusionsabhängige Sauerstoff- und / oder Nährstofflimitierungen zurück zu führen. Da die gemessene Glucosekonzentration im Kulturmedium (Abbildung 4.16 C) für alle Kultivierungen vergleichbar war, kann davon ausgegangen werden, dass der Verbrauch zumindest dieses Substrats nicht beeinträchtigt gewesen ist.

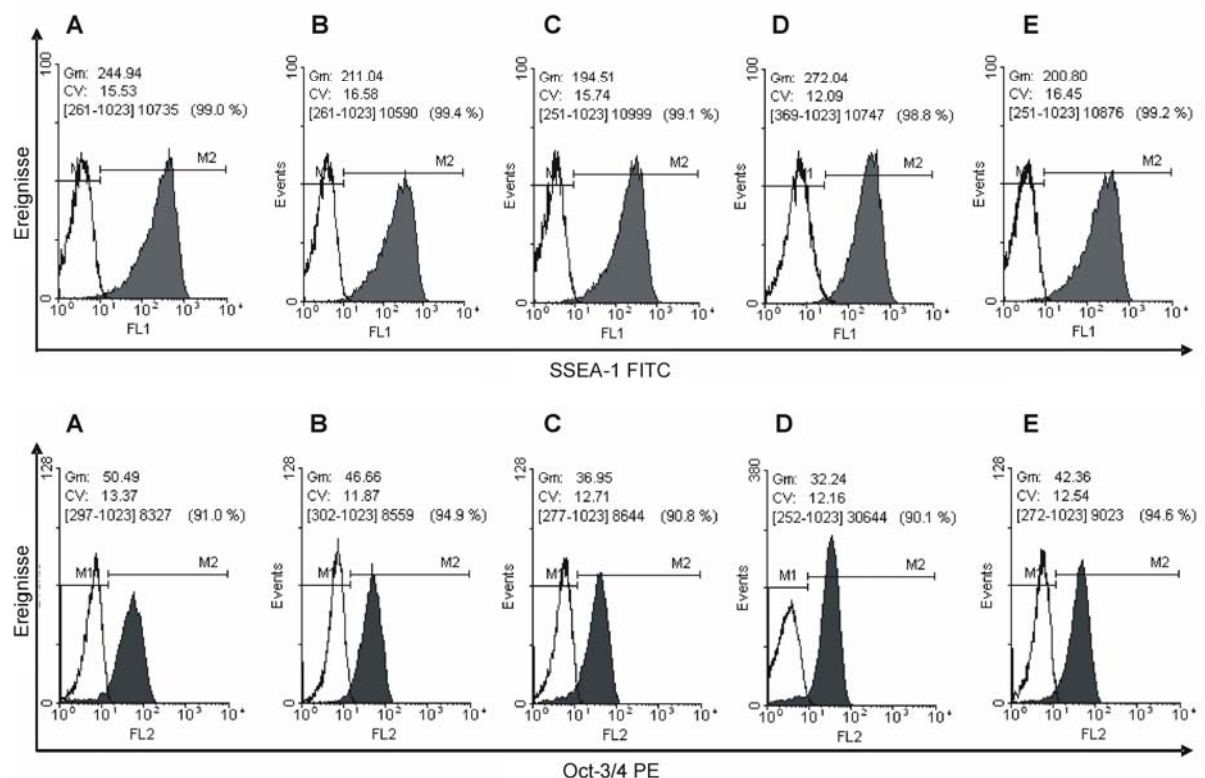
**Fazit:** Es konnte gezeigt werden, dass die Proliferation von suspendierten Brachyury ES-Zellen vom eingesetzten Kultivierungssystem abhängt. Statische Kultivierungen in Petrischalen sind lediglich bis zum dritten Kultivierungstag sinnvoll. Aufgrund der zunehmenden Zell- und somit Sphärendichte bei längerer Kultivierungszeit stoßen die Sphären aufeinander und können miteinander verwachsen. Dies führt letztendlich zu einer geringen Zellexpansion.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die Expansion in dynamischen Systemen auf die Pluripotenz und das Differenzierungspotential der Zellen einen Einfluss nimmt. Diese stellen weitere wichtige Kriterien dar, nach welchen die Kultivierungssysteme beurteilt werden sollten.

### 4.3.3 Pluripotenz

Im Anschluss an die Expansion der ES-Zellen unter dynamischen Bedingungen wurde die Pluripotenz der Zellen untersucht. Hierfür wurde die Proteinexpression der Pluripotenzmarker Oct-3/4 und SSEA-1 quantitativ mittels Durchflusszytometrie auf der Einzelzellebene analysiert. So konnten Expressionsniveaus der Zellen aus den verschiedenen Kultivierungen miteinander verglichen werden. Nach Fixierung und intrazellulärer Färbung mittels eines spezifischen monoklonalen Antikörpers wurde die Expression des Transkriptionsfaktors Oct-3/4 gemessen. Zur Bestimmung des Oberflächenproteins SSEA-1 wurden die Zellen direkt mit einem entsprechenden Antikörper inkubiert.

In der oberen Reihe der Abbildung 4.18 sind Histogramme der Expressionslevel für SSEA-1, in der unteren Reihe die für Oct-3/4 zu sehen. Bei Zellen aus allen Kultivierungssystemen konnte die Expression der Pluripotenzmarker Oct-3/4 und SSEA-1 nachgewiesen werden. Während gut 98 % der jeweiligen Zellpopulationen positiv für SSEA-1 waren, haben 90-94 % Oct-3/4 Expression aufgezeigt.



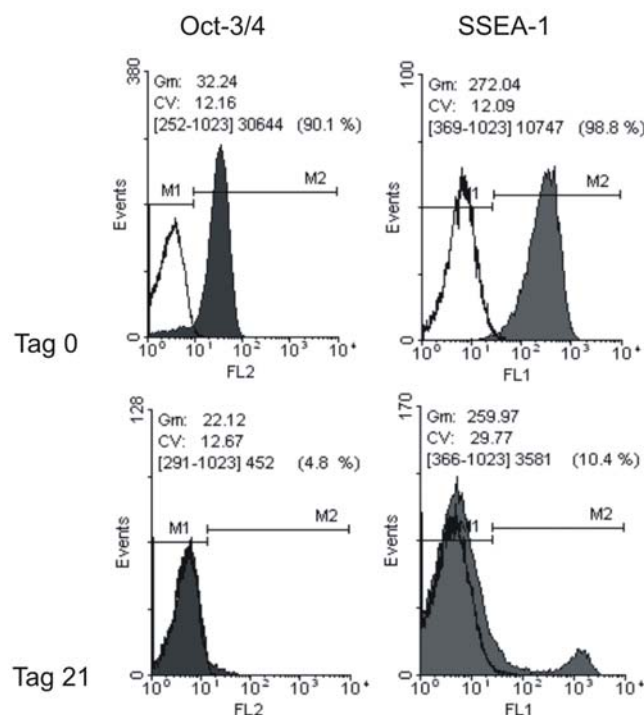
**Abbildung 4.18** SSEA-1 (oben) und Oct-3/4 Expression (unten) von Brachyury ES-Zellen im Anschluss an die Expansion in den verschiedenen Kultivierungssystemen A-E. A: Spinnerflasche 1, B: Spinnerflasche 2, C: Erlenmeyerkolben, D: CultiFlask 50, E: Petrischale. Ausgefüllte Histogramme: mit Anti-SSEA-1 FITC bzw. Anti-Oct-3/4 PE Antikörper gefärbte Zellen. Nicht ausgefüllte Histogramme: mit entsprechendem Isotypkontroll-Antikörper gefärbte Zellen. PE: Phycoerythrin, FITC: Fluoresceinisothiocyanat.

#### 4.3.4 Differenzierungspotential

Die Differenzierung wird beispielhaft nach erfolgter Langzeitkultivierung über sechs Passagen in CultiFlasks demonstriert. In diesem Fall wurden *Embryoid Bodies* nicht über hängende Tropfen erzeugt. Stattdessen wurde ein eigenes Protokoll entwickelt, mit dem *Embryoid Bodies* direkt aus Zellsphären gebildet werden konnten (das detaillierte Protokoll befindet sich in Abschnitt 6.6.10.2).

#### Herrunterregulierung der Expression von Oct-3/4 und SSEA-1

Oct-3/4 und SSEA-1 sind wichtige Pluripotenzmarker muriner embryonaler Stammzellen. Da diese beiden Marker nur im undifferenzierten Zustand exprimiert werden, ist eine Herunterregulierung im Verlauf der Differenzierung zu erwarten. Mithilfe der Durchflusszytometrie wurde die Expression dieser beiden Marker, wie im vorherigen Abschnitt erläutert, bestimmt. In Abbildung 4.19 sind die Oct-3/4 und SSEA-1 Expressionslevel an Tagen 0 und 21 der Differenzierung dargestellt.



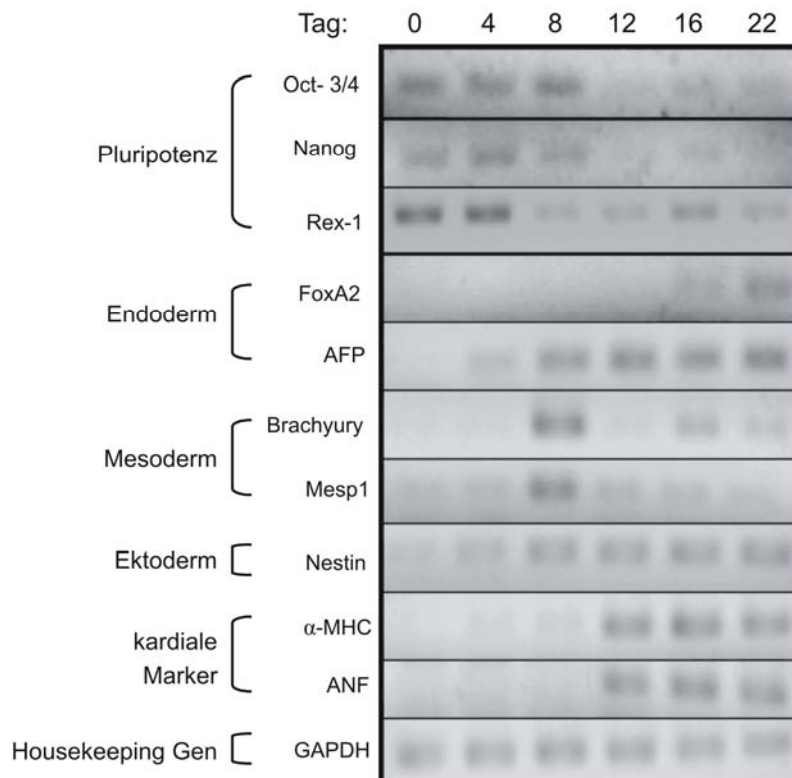
**Abbildung 4.19** Oct-3/4 und SSEA-1 Expression von Brachyury ES-Zellen an Tag 0 und Tag 21 der Differenzierung. Ausgefüllte Histogramme: mit Anti-SSEA-1 FITC bzw. Anti-Oct-3/4 PE Antikörper gefärbte Zellen. Nicht ausgefüllte Histogramme: mit entsprechendem Isotypkontroll-Antikörper gefärbte Zellen. PE: Phycoerythrin, FITC: Fluoresceinisothiocyanat.

Die Verschiebungen der positiven Signale nach erfolgter Differenzierung sind eindeutig in den Histogrammen erkennbar. Während 90,1 % der Zellpopulation zu Beginn der Differenzierungsphase Oct-3/4 positiv war, konnte nur noch bei knapp 5 % der Zellen an Tag 21 der Differenzierung eine Expression nachgewiesen werden. Die SSEA-1 Expression reduzierte sich dabei von 99 % auf eine kleine Restpopulation von 10 %.

#### Analyse des Genexpressionsprofils

Um die Expression weiterer Marker im Verlauf der Differenzierung zu erfassen, wurden RT (Reverse Transkriptase)-PCR Analysen von Proben an Tagen 0, 4, 8, 12, 16 und 22 der Differenzierung durchgeführt. Hierfür wurden an den entsprechenden Tagen RNA-Proben isoliert, von denen jeweils die gleiche Menge mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben worden ist. Diese wurde dann unter Verwendung genspezifischer *Primer* mittels PCR amplifiziert. Demzufolge wurde der zeitliche Verlauf der mRNA Expression von weiteren Pluripotenzmarkern wie *Nanog* und *Rex-1* (neben *Oct-3/4*), sowie von Markergenen, die die drei Keimblätter repräsentieren, verfolgt. Als Referenzgen (*housekeeping* Gen) diente Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (*GAPDH*).

In Abbildung 4.20 sind die Ergebnisse der PCR Analysen gezeigt. Bandenintensitäten von amplifizierten Genprodukten sind im zeitlichen Verlauf dargestellt. An den abnehmenden Bandenintensitäten von *Oct-3/4*, *Nanog* und *Rex-1* ist der Verlust der Pluripotenz nachzuvollziehen. Demgegenüber erschienen Banden für die endodermalen Marker *FoxA2* und *AFP* ab Tag 16 bzw. 4 der Differenzierung. Starke temporäre Expressionen von *Brachyury* und *Mesp1* konnten um Tag 8 der Differenzierung konstatiert werden. Bei *Mesp1* und *Brachyury* handelt es sich um frühe mesodermale bzw. mes-endodermale Markergene, deren Expression zu Beginn der Differenzierung steigt und später wieder herunterreguliert wird. Ab dem 4. Tag der Differenzierung konnte die Expression der ektodermalen *Nestin*-mRNA nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden Transkripte der kardialen Marker  $\alpha$ -MHC und *ANF* ab Tag 12 der Differenzierung detektiert. Diese werden in funktionalen Kardiomyozyten exprimiert. Die kardiale Differenzierung wird im nächsten Abschnitt näher behandelt.



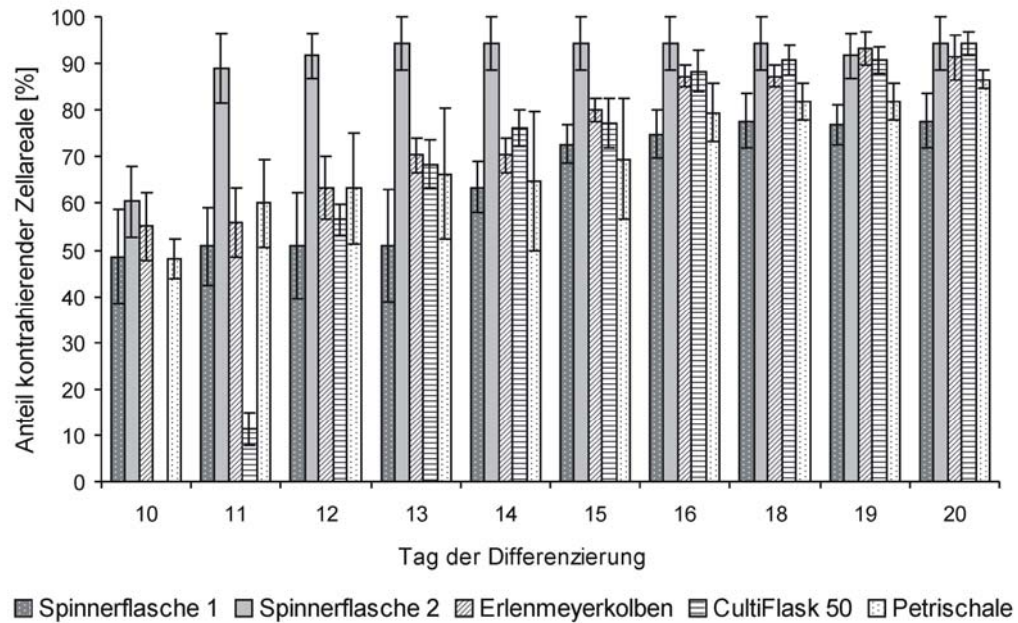
**Abbildung 4.20** Genexpressionsprofil von Brachyury ES-Zellen im Verlauf der Differenzierung. Abkürzungen: Oct-3/4: *Octamer binding transcription factor- 3/4*, FoxA2: *hepatocyte nuclear factor 3*, AFP:  $\alpha$ -Fetoprotein, Mesp1: *mesoderm posterior factor 1*,  $\alpha$ -MHC:  *$\alpha$ -myosin heavy chain*, ANF: *atrial natriuretic factor*, GAPDH: *Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase*.

### Spontane Differenzierung zu funktionalen Kardiomyozyten

Wie in Abschnitt 4.2 gezeigt, weist die murine embryonale Stammzelllinie Brachyury ein effizientes kardiales Differenzierungspotential auf. Es sollte untersucht werden, ob die Kultivierung undifferenzierter Zellen in den oben genannten dynamischen Systemen (siehe Tabelle 3) einen Einfluss auf die anschließende Differenzierung zu funktionalen Kardiomyozyten hat.

In Abbildung 4.21 ist der Anteil kontrahierender Zellareale von *Embryoid Bodies* im Verlauf der Differenzierung dargestellt. In allen Differenzierungskulturen konnte eine zeitliche Zunahme des Anteils kontrahierender Zellareale beobachtet werden. *Embryoid Bodies*, die aus Zellsphären hervorgegangen sind, die zuvor in der Spinnerflasche 2 gebildet wurden, zeigten ab Tag 11 der Differenzierung ein schnelles Erreichen einer Plateau-Phase mit Werten von über 90 % kontrahierender Areale. Darüber hinaus konnten keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Systemen festgestellt werden.





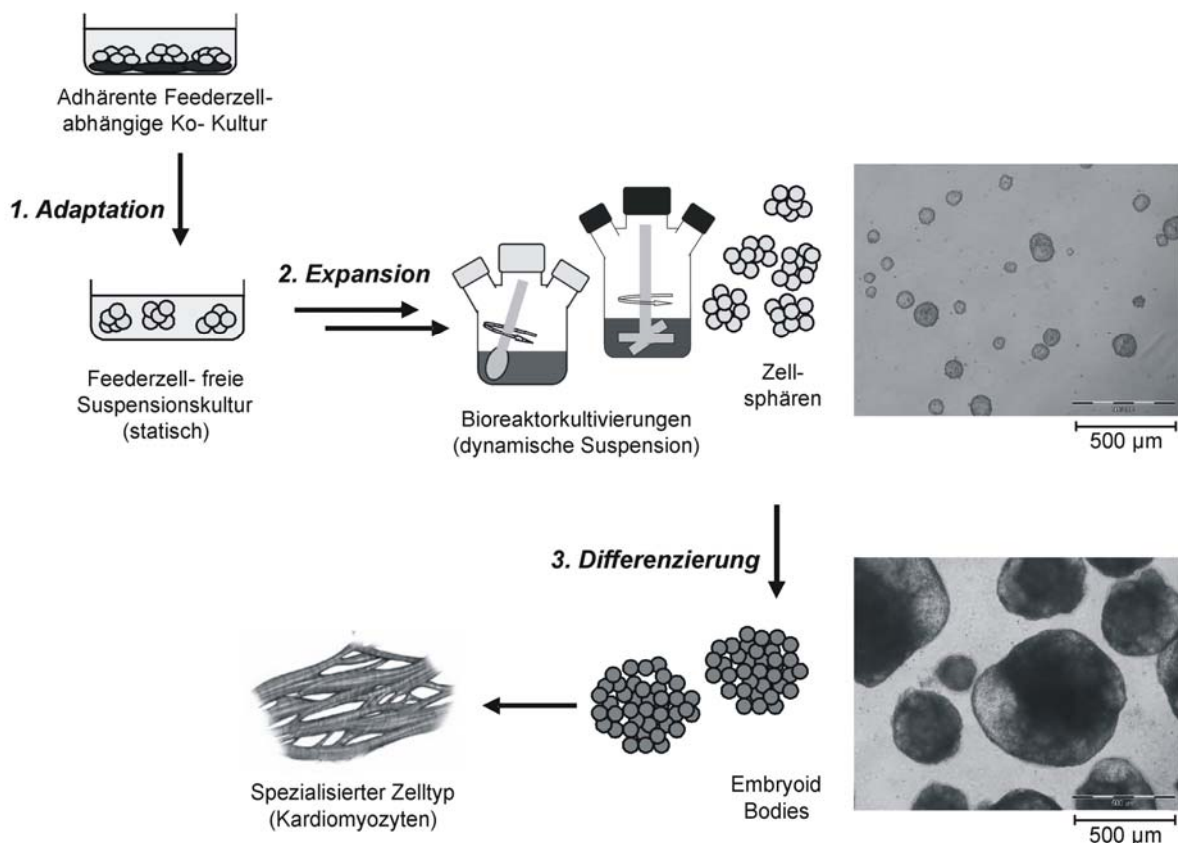
**Abbildung 4.21** Entwicklung von *Embryoid Bodies* in Differenzierungskulturen mit der Zeit. Dargestellt ist der mittlere Anteil kontrahierender Zellareale von ausplattierten *Embryoid Bodies*, die aus Zellsphären unter Verwendung der fünf Kultivierungssysteme hervorgegangen sind. Angegeben sind Mittelwerte aus mindestens vier Werten  $\pm$  Standardfehler.

**Fazit:** Es konnte gezeigt werden, dass die Brachyury ES-Zelllinie unter Erhalt ihrer Pluripotenz im undifferenzierten Zustand unter dynamischen Bedingungen expandiert werden kann. Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Pluripotenzmarkerexpression zwischen den verschiedenen Kultivierungssystemen festgestellt.

Nach erfolgter Expansion im undifferenzierten Zustand konnten die Brachyury ES-Zellen erfolgreich differenziert werden. Dabei wurde anstelle arbeitsintensiver hängender Tropfen die *Embryoid Body* Bildung direkt aus zuvor generierten suspendierten Zellsphären realisiert. Um die Differenzierung einzuleiten, wurden die Zellsphären lediglich in LIF freies Differenzierungsmedium überführt. Eine deutliche Abnahme der Expression von Pluripotenzmarkern auf Protein- sowie mRNA-Ebene ging mit steigenden mRNA Gehalten repräsentativer Differenzierungsmarkergene einher, wie mittels RT-PCR Analysen bestimmt wurde. Zudem konnte eine erfolgreiche spontane Differenzierung zu funktionalen Kardiomyozyten beobachtet werden. Insgesamt hatte die Wahl des Kultivierungssystems zur Erzeugung von undifferenzierten ES-Zellsphären keinen signifikanten Einfluss auf das Differenzierungspotential der resultierenden *Embryoid Bodies*.

### 4.3.5 Zusammenfassung und Diskussion der Suspensionskulturen

In Abbildung 4.22 ist eine zusammenfassende Übersicht über die erfolgten Arbeiten dargestellt. Ausgangspunkt war eine Feederzell-abhängige Ko-Kultur der murinen ES-Zelllinie Brachyury, die zunächst auf ein Wachstum unter Suspensionsbedingungen adaptiert wurde.



**Abbildung 4.22** Zusammenfassende Übersicht der Entwicklung und Anwendung von Suspensionskulturen embryonaler Stammzellen.

Nach erfolgreicher Anpassung der ES-Zellen an statische Suspensionsbedingungen konnte gezeigt werden, dass verschiedene dynamische Kultivierungssysteme zur Expansion undifferenzierter ES-Zellen eingesetzt werden können. Es wurde festgestellt, dass die Durchmischungsverhältnisse innerhalb von gerührten bzw. geschüttelten Kultivierungssystemen einen bedeutenden Einfluss auf das Verklumpen von ES-Zellen bzw. Zellsphären haben.

In Abschnitt 4.3.2 wurde die Proliferation suspendierter ES-Zellen in Abhängigkeit des eingesetzten Kultivierungssystems untersucht. Dabei konnte das beste Wachstum in Erlenmeyerkolben, einer Pendel-Spinnerflasche sowie in CultiFlasks festgestellt werden.

Gleichzeitig wurden in diesen Systemen in der Regel Zellsphären geringer Größe beobachtet, während in Kultivierungen mit geringer Zellausbeute größere Sphären erzeugt wurden. Um dieses Phänomen quantitativ zu erfassen, wurden mithilfe eines für diesen Zweck entwickelten Algorithmus Bilder fotografierte Sphären im Verlauf der Kultivierungen ausgewertet. So konnten zahlreiche Bilder erfasst und die Entwicklung der Sphärengröße im zeitlichen Verlauf automatisiert ausgewertet werden. Es wurde deutlich, dass die mittlere Sphärengröße an Tagen 3 und 4 in den Kultivierungssystemen mit hoher Zellausbeute geringer war als die Größe von Sphären aus Kultivierungen, die zu geringen Zellexpansionen führten.

Damit kann folgender Zusammenhang festgestellt werden: mit zunehmender Sphärengröße sinkt die proliferative Kapazität der ES-Zellen. Folglich besteht eine hoch proliferative Population an ES-Zellen aus vielen, kleinen Sphären, während große Sphären mit geringem Zellwachstum einhergehen.

Diese Beobachtungen führen zur Schlussfolgerung, dass die Sphärenbildung aus aktiver Zellteilung sowie einem „passiven“ Anteil resultiert. Die Sphärenbildung erfolgt nicht ausschließlich ausgehend von einer Einzelzelle, sondern mehrere Einzelzellen stoßen anfangs aneinander und bilden ein kleines Aggregat, dieses vergrößert sich im weiteren Verlauf durch aktive Zellteilung proliferierender Zellen.

Wie groß der passive Anteil der Sphärenbildung ist, hängt von den Strömungsverhältnissen ab und hat in den verschiedenen Systemen offensichtlich unterschiedliche Auswirkungen auf die Zellexpansion:

##### *Kultivierungen mit geringer Zellausbeute:*

Die Sphärenbildung besteht zunächst in der Summe aus aktiver Sphärenvergrößerung durch Zellteilung und einem passiven Aggregieren von Einzelzellen und /oder Sphären. Mit fortschreitender starker Sphärenvergrößerung nimmt die proliferative Kapazität der Zellen in diesen Sphären ab, so dass letztlich der passive Anteil (die Verklumpung) für die Sphärenvergrößerung maßgeblich ist. Die Strömung in diesem System (hier Spinnerflasche 2) wirkt „konzentrierend“ und resultiert in wenigen, dafür großen Sphären.

##### *Kultivierungen mit hoher Zellausbeute:*

Die Sphärenbildung besteht aus aktiver Sphärenvergrößerung durch Zellteilung, während die hydrodynamischen Kräfte der Sphärenvergrößerung *entgegenwirken*.

Dies geschieht entweder durch mechanische Verkleinerung von Sphären durch ein „Ablösen“ von (differenzierenden) Zellen an der Sphärenoberfläche<sup>50</sup> und / oder weil die Strömung der Art ausgeprägt ist, dass die Wahrscheinlichkeit des Aufeinandertreffens von Einzelzellen und / oder Sphären verringert wird. Die Strömung in diesen Systemen (hier Erlenmeyerkolben, CultiFlasks, Spinnerflasche 1) wirkt „verdünnend“. Ein aktives Zellwachstum ohne gleichzeitiges Aggregieren von Sphären findet statt; dies resultiert in zahlreichen, separaten Sphären geringer Größe.

Unabhängig vom eingesetzten Kultivierungssystem konnte die Pluripotenz der ES-Zellen nach Langzeitkultivierung in Feederzell-freier Suspensionskultur demonstriert werden. Diese wurde anhand der Expression von Oct-3/4 und SSEA-1 mittels durchflusszytometrischer Analyse bestimmt. Im Anschluss an die Expansionsphase haben die ES-Zellen *Embryoid Bodies* gebildet und konnten zu Zelltypen aller drei Keimblätter differenziert werden, wie anhand der mRNA Expression repräsentativer Markergene gezeigt wurde. Auch hatte die Wahl des Kultivierungssystems keinen signifikanten Einfluss auf das kardiale Differenzierungspotential. Die Differenzierung selbst wurde allerdings unter statischen Standardbedingungen durchgeführt. Weiterführende Arbeiten könnten zeigen, ob eine Differenzierung (bzw. die *Embryoid Body* Bildung) unter dynamischen Bedingungen einen Einfluss auf das Differenzierungspotential haben könnte.

## 4.4 Anwendung von Suspensionskulturen auf induzierte pluripotente Stammzellen

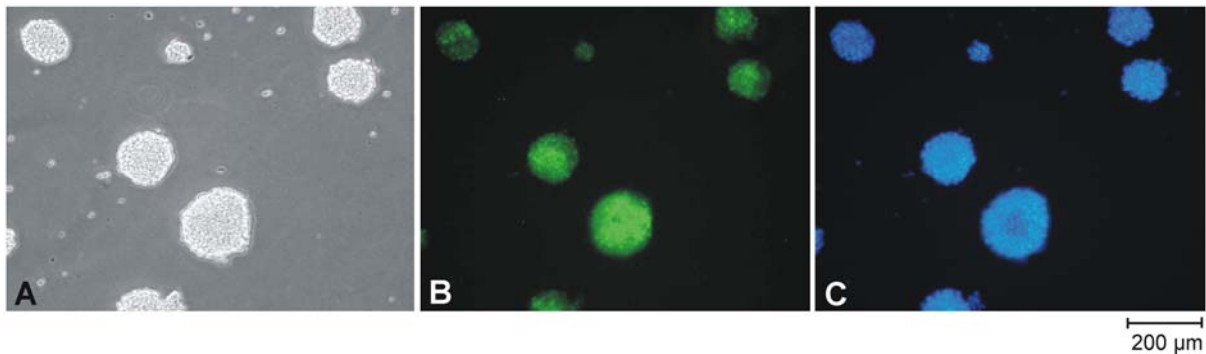
Seit es erstmals gelungen ist, leicht zu gewinnende somatische Zellen des Körpers durch eine molekulare Reprogrammierung zu induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen) umzuwandeln<sup>9, 10</sup>, werden diese intensiv erforscht. iPS-Zellen weisen Eigenschaften auf, die bisher nur in embryonalen Stammzellen beobachtet wurden (siehe Abschnitt 2.1.4). Seither wird eine funktionale Charakterisierung der iPS-Zellen durchgeführt, um ihr tatsächliches Potential im Hinblick auf einen zukünftigen klinischen Einsatz zu beurteilen.

Basierend auf den Erkenntnissen, die aus den Versuchen mit der embryonalen Stammzelllinie Brachyury gewonnen werden konnten, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Suspensionskultur von iPS-Zellen etabliert und charakterisiert werden.

### 4.4.1 *Charakterisierung suspendierter induzierter pluripotenter Stammzellen*

Die murinen iPS-Zellen YM100 (Klon „M15“) wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Ulrich Martin (Klinik für Herz-, Thorax-, Transplantations- und Gefäßchirurgie (HTTG), Medizinische Hochschule Hannover) bereitgestellt. Diese Zellen verfügen über ein GFP-Reporterprotein unter der Kontrolle des endogenen Oct-3/4 Promoters, da sie aus OG2-Fibroblasten<sup>127</sup> hergestellt wurden. Die grüne Fluoreszenz der Zellen konnte damit als Maß für die Aktivität des Oct-3/4 Promoters herangezogen werden und wurde zur Grundlage eines *Monitorings* während des Adaptationsprozesses der Zellen auf suspendierte Bedingungen.

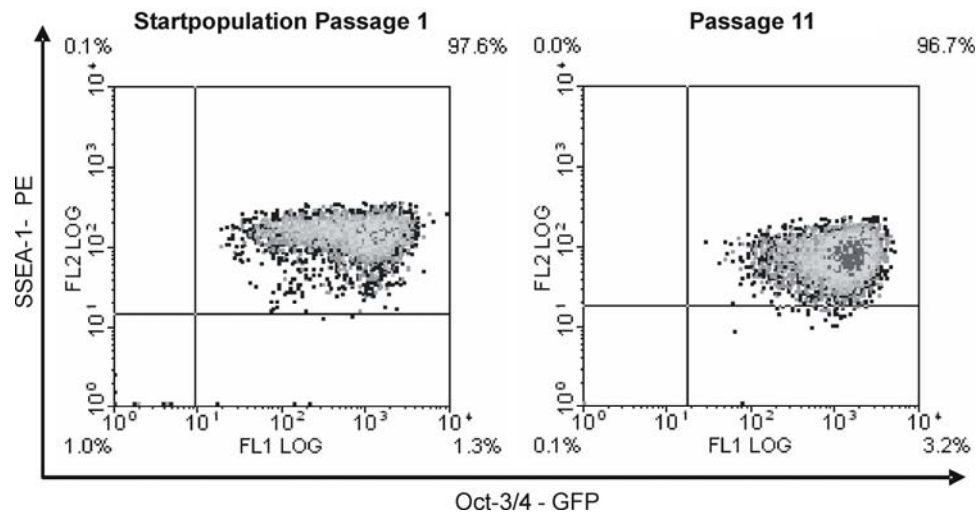
Die Adaptation erfolgte im Wesentlichen wie bereits für die Brachyury ES-Zellen beschrieben wurde (siehe Abschnitt 4.1). Durch den Einsatz unbeschichteter Petrischalen und einer 10-fachen Konzentration von LIF im Kulturmedium konnte eine Feederzell-freie iPS-Zellpopulation erhalten werden. Die Zellen proliferierten dabei ebenfalls in Form dreidimensionaler Sphären in Suspension (siehe Abbildung 4.23). Dabei wiesen sie eine geringere Verdopplungszeit  $t_D$  auf als die embryonalen Stammzellen, nämlich  $ca. 28,5 \pm 2,41 \text{ h}$  mit einer mittleren spezifischen Wachstumsrate  $\mu$  von  $0,024 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$  (siehe Abschnitt 6.6.8.7). Die optimale Animpfdichte wurde zu  $4 \cdot 10^4$  Zellen / ml bestimmt. Über die GFP Expression fand eine kontinuierliche „Qualitätskontrolle“ statt, die wichtige Informationen über den undifferenzierten Zustand der Zellen lieferte.



**Abbildung 4.23** Sphären von iPS-Zellen YM100 in Suspensionskultur. Dargestellt sind sieben suspendiert wachsende Zellsphären bzw. Zellaggregate unter Feederzell-freien Bedingungen. A: Lichtmikroskopische Aufnahme, B und C: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zur Visualisierung der GFP-Expression sowie der Zellkerne mittels Dapi-Färbung.

### Pluripotenz

Neben täglichen fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen der GFP Fluoreszenz wurde der Erhalt der Pluripotenz quantitativ mittels Durchflusszytometrie verfolgt. So wurde die Expression von Oct-3/4 anhand der GFP Fluoreszenz quantifiziert, während die SSEA-1 Expression über die Färbung mit einem monoklonalen Anti-SSEA-1-PE markierten Antikörper in einer multiparametrischen Messung bestimmt wurde (das genaue Protokoll ist in Abschnitt 6.6.11 zu finden). In Abbildung 4.24 sind Dot-Plots (zweidimensionale Darstellungen) der Oct-3/4 zu SSEA-1 Expression der Zellen dargestellt. Es ist erkennbar, dass die Zellpopulation einen stabilen Phänotyp bezüglich dieser beiden Pluripotenzmarker aufwies. Wie die Startpopulation (Passage 1 nach Ablösen von Feederzellen) exprimierten gut 97 % der Population auch nach elf Passagen in Suspensionskultur beide Marker.

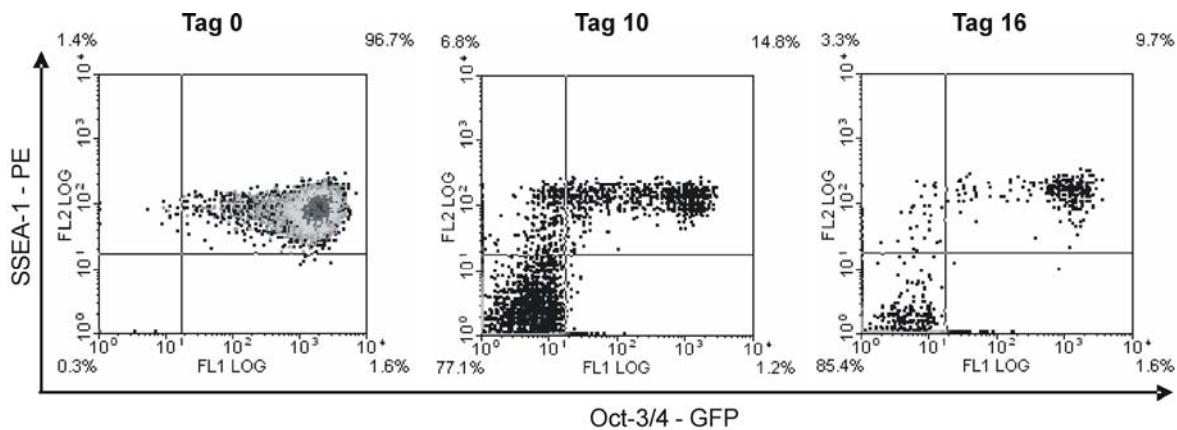


**Abbildung 4.24** Density-Plots (zweidimensionale Darstellungen) der Oct-3/4 zu SSEA-1 Expression von iPS-Zellen YM100 der Startpopulation und nach elf kontinuierlichen Passagen in Feederzell-freier Suspensionskultur. Zellen wurden mit einem Anti-SSEA-1-PE Antikörper gefärbt, während die Oct-3/4 Expression anhand des GFP-Signals quantifiziert wurde. Lebende Zellen wurden anhand der Propidiumiodidsignale gegatet.

### Differenzierungspotenzial

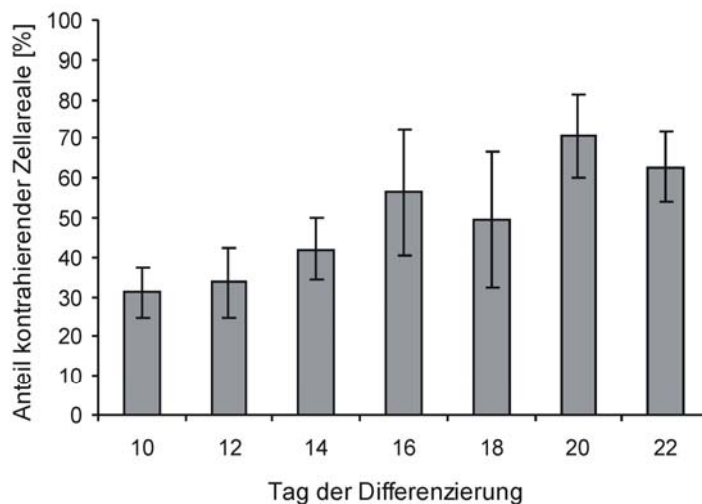
Das Vermögen der iPS-Zellen, nach Entfernen von LIF aus dem Kulturmedium *Embryoid Bodies* zu bilden und zu differenzieren, wurde ebenso durchflusszytometrisch untersucht. In Anlehnung an die im vorherigen Abschnitt beschriebene Messmethode wurde in Differenzierungskulturen von iPS-Zellen die Herunterregulierung von Oct-3/4 und SSEA-1 verfolgt.

In Abbildung 4.25 sind die Ergebnisse von Messungen an Tagen 0, 10 und 16 der Differenzierung zu sehen. Während an Tag 0 (Start der Differenzierung) noch über 96 % der Population die beiden Marker Oct-3/4 und SSEA-1 exprimiert (Quadrant oben rechts), war an Tag 10 eine deutliche Verschiebung des Signals zu erkennen. Nur noch 14,8 % der Population exprimierten die Marker, während bereits 77,1 % negativ waren (Quadrant unten links). Am 16. Differenzierungstag verringerte sich das positive Signal auf 9,7 %, während 85,4 % der Population für keinen der beiden Marker positiv gefärbt wurden. Die zweidimensionale Darstellung der Fluoreszenzsignale lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Zellen in Differenzierungskulturen als Antwort auf das Fehlen von LIF zunächst die Expression von Oct-3/4 herunterregulieren, während die Expression von SSEA-1 erst später reguliert wird. Alle Zellen, die SSEA-1 negativ waren, zeigten auch keine Oct-3/4 Expression mehr.



**Abbildung 4.25** Dichteplots (zweidimensionale Darstellungen) der Oct-3/4 zu SSEA-1 Expression von iPS-Zellen YM100 im zeitlichen Verlauf der Differenzierung. Zellen wurden mit einem anti-SSEA-1 PE Antikörper gefärbt, während die Oct-3/4 Expression anhand des GFP-Signals quantifiziert wurde. Lebende Zellen wurden anhand der Propidiumiodidsignale gegatet.

Zur weiteren funktionalen Charakterisierung der Differenzierung von iPS-Zellen nach Adaptation auf Suspensionsbedingungen wurde das kardiale Differenzierungspotential untersucht (das Protokoll der Differenzierung ist in Abschnitt 6.6.10.2 zu finden).



**Abbildung 4.26** Entwicklung von *Embryoid Bodies* in Differenzierungskulturen von iPS-Zellen YM100 mit der Zeit. Dargestellt ist der mittlere Anteil kontrahierender Zellareale von ausplattierten *Embryoid Bodies*, die aus in Suspension expandierten Zellsphären hervorgegangen sind. Angegeben sind Mittelwerte aus sechs Werten  $\pm$  Standardfehler.

In Abbildung 4.26 ist der Anteil kontrahierender Zellareale von *Embryoid Bodies* im Verlauf der Differenzierung dargestellt, wobei eine zeitliche Zunahme des Anteils kontrahierender Areale konstatiert werden konnte. Dieser Anteil war jedoch insgesamt geringer als bei Brachyury ES-Zellen beobachtet (siehe Abschnitt 4.2). An Tag 20 der Differenzierungskultur



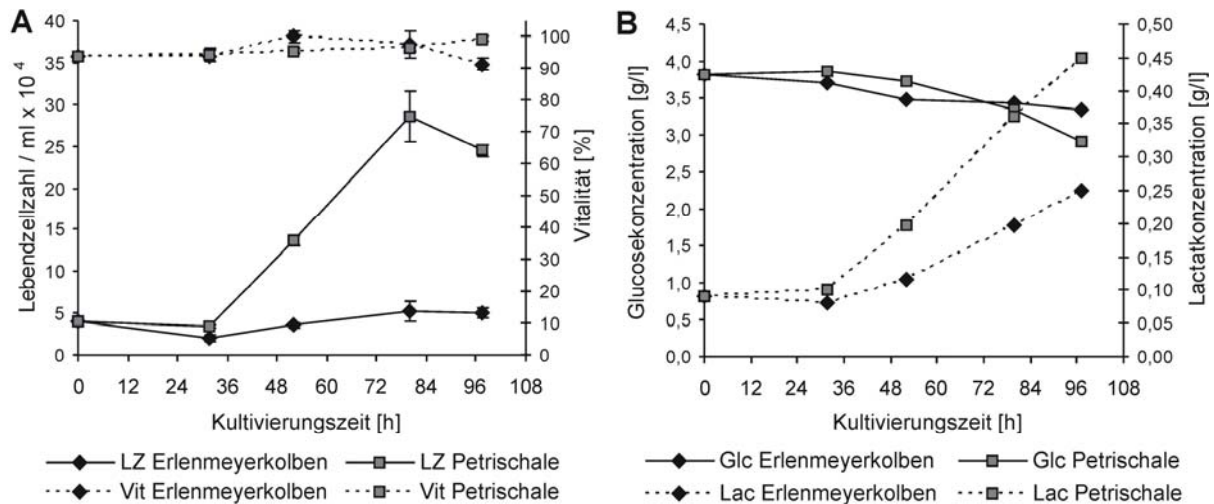
wurde ein maximaler Wert von  $70,7 \pm 10,8$  % erreicht.

**Fazit:** Die murinen induzierten pluripotenten Stammzellen YM100 konnten von adhärenenten, Feederzell-abhängigen Kulturen auf Feederzell-freie Suspensionsbedingungen adaptiert werden. Dabei proliferierten die Zellen in Form dreidimensionaler, suspendierter Sphären, die eine stabile Expression der Pluripotenzmarker Oct-3/4 und SSEA-1 aufzeigten. Die Zellen behielten ihre Fähigkeit, *Embryoid Bodies* zu bilden und ließen sich zu funktionalen Kardiomyozyten differenzieren.

### 4.4.2 *Dynamische Suspensionskultur*

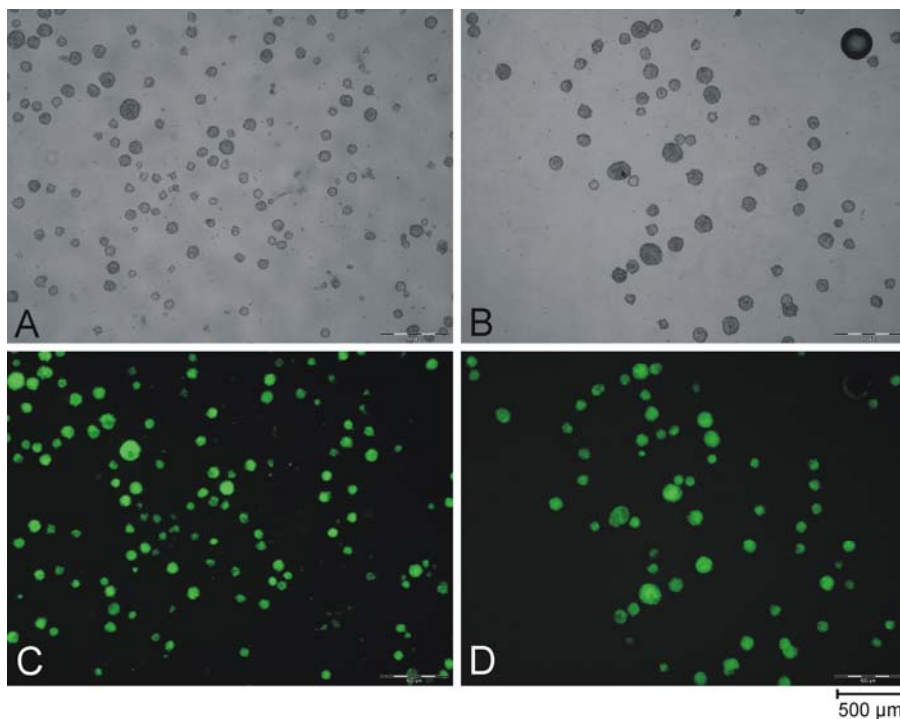
Im Abschnitt 4.3.2 wurden dynamische Suspensionskulturen embryonaler Stammzellen charakterisiert. Dabei hat der Einsatz von Schüttelkolben in der Regel zu höchsten Zelldichten geführt. Nun sollte untersucht werden, ob sich suspendierte iPS-Zellen ebenso gut in diesem Kultivierungssystem propagieren lassen. Analog zur Kultivierung der ES-Zellen wurde auch in diesem Fall eine Schüttelgeschwindigkeit von 110 rpm verwendet.

In Abbildung 4.27 A ist das Wachstum von iPS-Zellen in Erlenmeyerkolben- sowie Petrischalenkultivierungen dargestellt. Erreichten die Zellen in der Petrischale nach 80 h der Satzkultur eine maximale Dichte von  $28 \cdot 10^4$  lebenden Zellen / ml, so konnte im Erlenmeyerkolben keine effektive Zellzahlzunahme beobachtet werden. Selbst nach 98 h wurde lediglich eine Zelldichte von  $5 \cdot 10^4$  / ml bestimmt, die nur knapp über der jeweiligen Animpfdichte der Kulturen lag ( $4 \cdot 10^4$  / ml). Interessanterweise verblieb die Vitalität der Zellen in beiden Kultivierungssystemen jedoch stets über 90 %. Die Vitalität wurde mittels Trypanblau-Ausschluss unter Verwendung einer Zählkammer bestimmt. Werden Glucosekonzentrationen im Medium miteinander verglichen (siehe Abbildung 4.27 B), konnte ein etwas stärkerer Verbrauch des Substrats in der Petrischalenkultivierung festgestellt werden. Anbetrachts der deutlich niedrigeren Lactatkonzentration im Medium der Erlenmeyerkolbenkultivierung (0,25 g / l im Vergleich zu 0,46 g / l in der Petrischale) konnte insgesamt eine geringere metabolische Aktivität der Zellen in diesem Kultivierungssystem angenommen werden.



**Abbildung 4.27** Charakterisierung von iPS-Zellen YM100 kultiviert im Erlenmeyerkolben und in der Petrischale. A: Dargestellt sind Wachstumskurven und Vitalität. Angegeben sind Mittelwerte aus vier Werten  $\pm$  Standardfehler. B: Die Glucose- und Lactatkonzentrationen im Kulturmedium sind gezeigt. Angegeben sind die Werte einer Einfachbestimmung. Abkürzungen: LZ: Lebendzellzahl, Vit: Vitalität, Glc: Glucose, Lac: Lactat.

Zusätzlich wurde die Morphologie der Zellen in beiden Kultivierungssystemen untersucht. Wie in Abbildung 4.28 zu sehen, haben sich auch in der Erlenmeyerkolbenkultur die charakteristischen Zellsphären ausgebildet (Abbildung 4.28 A und C).



**Abbildung 4.28** iPS-Zellsphären nach 98 h in Erlenmeyerkolben- (A, C) und in Petrischalenkultur (B, D). A und B: Lichtmikroskopische Aufnahmen, C und D: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zur Visualisierung der GFP-Fluoreszenz.

Da diese eine vergleichbare GFP Fluoreszenz aufwiesen wie die Sphären aus der Petrischalenkultur (Abbildung 4.28 D), konnte von einer unveränderten Oct-3/4 Expression ausgegangen werden. Warum die Zellen im Schüttelkolben nicht proliferierten, bleibt angesichts der Vitalität und Morphologie der Zellen bzw. Zellsphären offen. Eine mögliche Erklärung wären die Strömungsbedingungen im Schüttelkolben bei 110 rpm, die zwar für ES-Zellen günstig, für die induzierten pluripotenten Stammzellen jedoch nachteilig gewesen sein könnten. Physikalisch geschädigte iPS-Zellen sind möglicherweise recht schnell lysiert worden, so dass sie in der Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau-Ausschluss nicht als tote Zellen bestimmt werden konnten. Damit würden sich die hohen Vitalitätswerte trotz mangelnden Zellwachstums erklären lassen (Abbildung 4.27 A). Da dennoch Zellsphärenbildung und eine, wenn auch geringere, metabolische Aktivität beobachtet werden konnten, ist der Schüttelkolben prinzipiell nicht als dynamisches Suspensionskultivierungssystem für iPS-Zellen auszuschließen. Allerdings sind weitere Optimierungen der Schüttelgeschwindigkeit und Animpfdichte durchzuführen, um auch hier eine effiziente Expansion undifferenzierter, suspendierter iPS-Zellen zu realisieren.

#### **4.4.3 Zusammenfassung und Diskussion**

Murine induzierte pluripotente Stammzellen YM100 konnten von Feederzell-abhängigen adhärennten Ko-Kulturen auf Suspensionsbedingungen adaptiert werden. Die transgene GFP Expression ermöglichte dabei ein einfaches *Monitoring* der Oct-3/4 Expression, die einen wichtigen Rückschluss auf den pluripotenten Zustand der Zellen lieferte. So konnte eine simultane Messung des Oberflächenmarkers SSEA-1 und der indirekten Oct-3/4 Expression auf einfache Weise durchgeführt werden, so dass auf eine anspruchsvolle Doppelfärbung von intra- und extrazellulären Markern mit Fixierung und Permeabilisierung verzichtet werden konnte.

Die suspendiert proliferierenden iPS-Zellen bildeten nach Entfernen von LIF aus dem Kulturmedium *Embryoid Bodies*, von denen bis zu 70,7 % kontrahierende Zellareale aufwiesen. Dieser Wert lag unter den Werten (> 90 %), die für diesen iPS-Zellklon („M15“) in üblicher Feederzellen Ko-Kultur beobachtet werden konnten (mündliche Information aus der Klinik für HTTG). Ob das Nachlassen der funktionalen kardialen Differenzierung auf die suspendierten Bedingungen zurück zu führen ist, bleibt allerdings offen und müsste in weiteren Differenzierungskulturen bestätigt werden. Möglicherweise bedarf es einer

Optimierung des Differenzierungsprotokolls. So kann zum Beispiel der Zeitpunkt des Ausplattierens der anfangs noch suspendiert vorliegenden *Embryoid Bodies* auf Gelatine beschichtete Zellkulturplatten einen Einfluss auf die weitere Entwicklung haben. In diesem Fall wurde das Protokoll, das anhand von suspendierten Brachyury ES-Zellen entwickelt wurde, auf die iPS-Zelldifferenzierung angewendet. Dass ein unmittelbarer Transfer der bestimmten Kultivierungsbedingungen von ES- auf iPS-Zellen nicht grundsätzlich möglich ist, zeigte auch die Schüttelkolbenkultivierung. Wurde dieses Kultivierungssystem für eine Expansion von ES-Zellen als hoch effektiv beurteilt (Abschnitt 4.3.2), konnten die iPS-Zellen unter diesen Bedingungen nicht vermehrt werden. Zwar bildeten sich Zellsphären aus, eine Zunahme der Gesamtzellzahl konnte jedoch nicht festgestellt werden. Eine Anpassung der Kultivierungsparameter auf iPS-Zellen bleibt somit Gegenstand weiterer vergleichender Studien. Dass Langzeitsuspensionskulturen von iPS-Zellen über einen Zeitraum von mehr als zehn Passagen realisierbar sind, konnte in dieser Arbeit anhand von statischen Petrischalenkulturen jedoch erfolgreich demonstriert werden.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Fernziele der regenerativen Medizin und des *Tissue Engineerings* mit Stammzellen sind die Unterstützung der Regeneration oder gar der vollständige Ersatz beschädigten oder zerstörten Gewebes. Des Weiteren sind Stammzellen im Bereich der Wirkstoff- und Toxizitätstestung von großer Bedeutung. Präklinische Studien von potentiell biologisch aktiven Wirkstoffen sind häufig auf einen speziellen Zelltypen angewiesen, anhand dessen die Funktionalität des zu untersuchenden *Targets* beurteilt werden muss.

Um diese vielfältigen Anwendungen von Stammzellen zu ermöglichen, werden in jedem Fall große Mengen an Zellen benötigt. Voraussetzung sind Kultivierungsverfahren, mit denen eine kontrollierbare und reproduzierbare Herstellung dieser Zellen im großen Maßstab realisiert werden kann.

In dieser Arbeit wurden zwei wesentliche Aspekte der Stammzellkultivierung in Betracht gezogen. Die Produktion von Zytokinen, die essentiell für das Proliferationspotential von Stammzellen sind sowie die Untersuchung und Charakterisierung verschiedener Kultivierungssysteme für Stammzellen. Ziel der Wachstumsfaktorproduktion ist das Schaffen einer Quelle für hochgradig reine und in großen Mengen verfügbare Zytokine, die die Wirtschaftlichkeit von *large scale* Stammzellkulturen gewährleistet. So wurde zunächst ein Produktions- und Aufreinigungsprozess für hFGF-2 unter Verwendung eines rekombinanten *E. coli* Stammes beschrieben. Nach erfolgter 2-stufiger chromatographischer Aufreinigung mittels Kationenaustausch- und Heparinaffinitätschromatographie wurden Aktivitätsassays entwickelt, mit denen die Funktionalität des aufgereinigten Proteins demonstriert werden konnte. Während hFGF-2 das Neuritenwachstum von PC-12 Zellen induzieren konnte, wurde die Proliferation von NIH-3T3 Zellen positiv stimuliert. Darüber hinaus wurde in Zusammenarbeit mit der Klinik für Herz-, Thorax-, Transplantations- und Gefäßchirurgie der Medizinischen Hochschule Hannover mittels Kulturen von primaten (Rhesusaffen) embryonalen Stammzellen die Fähigkeit des aufgereinigten hFGF-2 bewiesen, den undifferenzierten Phänotyp der Zellen zu erhalten. Der Transfer des Produktionsmaßstabes aus Schüttelkolben- in Bioreaktor basierte Fermentationsprozesse wurde von Chen Ran am Institut für Technische Chemie durchgeführt<sup>88</sup>.

Des Weiteren wurde ein umfassender Produktions- und Aufreinigungsprozess für das Zytokin hLIF entwickelt. In Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Dr. Axel Schambach vom Institut für Experimentelle Hämatologie wurde hierfür ein Expressionsvektor konstruiert, in dem das hLIF in Form eines Fusionsproteins mit N-terminalem Thioredoxin gebildet wurde. Über eine IMAC konnte das Fusionsprotein zunächst aufgereinigt werden. Die zur Freisetzung des hLIF notwendige TEV-Protease wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls rekombinant hergestellt und konnte erfolgreich eingesetzt werden. In einem letzten Reinigungsschritt mittels Kationenaustauschchromatographie konnte das abgespaltene hLIF schließlich als reines Protein erhalten werden. Auch für dieses Zytokin wurden Aktivitätsassays entwickelt. Diese basierten auf Suspensionskulturen muriner ES- und iPS-Zellen. So konnten die Zellen über zahlreiche Passagen in ihrem undifferenzierten Zustand gehalten werden, wie anhand ihrer Proliferation und der Expression von SSEA-1 und Oct-3/4 demonstriert wurde.

Die Anwendung von Suspensionskulturen pluripotenter Stammzellen für die biologische Testung des hLIF erwies sich als äußerst effizient, da die Zellen unter diesen Bedingungen bereits nach ein- bis zwei Passagen auf das Zytokin LIF reagierten. Im Vergleich dazu mussten ES-Zellen, die unter üblichen Feederzell-haltigen und adhärennten Bedingungen für eine LIF-Testung eingesetzt wurden, mindestens über fünf Passagen kultiviert werden, um einen Effekt des Zytokins nachzuweisen. Diese Tests wurden von Herrn Dr. Tobias Cantz der *Junior Research Group* „Stem Cell Biology“ durchgeführt und bestätigten die positiven Ergebnisse der in dieser Arbeit beschriebenen hLIF-Testung.

Die beiden produzierten Zytokine hFGF-2 und hLIF wurden an verschiedene „Rebirth“-Arbeitsgruppen weitergegeben und werden erfolgreich eingesetzt. Darüber hinaus diente das hLIF im Rahmen dieser Arbeit der Kultivierung muriner ES- und iPS-Zellen, die als Modellzelllinien zur Entwicklung und Charakterisierung von Kultivierungssystemen eingesetzt wurden.

In diesem weiteren Teil der Arbeit wurden zunächst adhärent und in Feederzellen-Ko-Kultur wachsende murine ES-Zellen erfolgreich an Suspensionsbedingungen adaptiert. Dies schaffte die Grundlage für diverse statische und insbesondere dynamische Kultivierungen. Es wurde gezeigt, dass Brachyury ES-Zellen unter dynamischen Suspensionsbedingungen kultiviert und vermehrt werden können, wobei eine Reihe verschiedener Kultivierungssysteme wie Spinnerflaschen (im Maßstab von 50 ml), Erlenmeyerkolben

(25 ml) und CultiFlask Tubes (15 ml) eingesetzt werden können. Um eine Bildung von Zellsphären zu gewährleisten, bedurfte es einer individuellen Anpassung der Rühr- bzw. Schüttelgeschwindigkeit.

Ferner wurde gezeigt, dass die Proliferation suspendierter ES-Zellen vom eingesetzten Kultivierungssystem abhängt. Dabei konnte die Proliferation der Zellen in einen Zusammenhang mit der Sphärengröße gebracht werden. Die Sphärengröße wurde dabei mithilfe eines für diesen Zweck entwickelten bildbearbeitenden Algorithmus bestimmt. Es wurde beobachtet, dass eine hoch proliferative Population an ES-Zellen aus vielen, kleinen Sphären besteht, während große Sphären mit geringem Zellwachstum einhergehen. Als mögliche Ursache für die unterschiedliche Größe der Sphären werden die verschiedenen Strömungsverhältnisse in den Suspensionssystemen vermutet.

Im Anschluss an die Expansion in dynamischer Suspensionskultur wurde die Pluripotenz der ES-Zellen untersucht. Unabhängig vom eingesetzten System konnte bei allen Zellen gleichermaßen die Expression von SSEA-1 und Oct-3/4 festgestellt werden, woraus geschlossen werden kann, dass die dynamische Umgebung der Zellen keinen Einfluss auf die Pluripotenz hat. Darüber hinaus konnten die in dynamischer Suspension expandierten ES-Zellen *Embryoid Bodies* ausbilden und zu Zelltypen aller drei Keimblätter differenziert werden. Ferner konnten keine wesentlichen Unterschiede im spontanen kardialen Differenzierungspotential von *Embryoid Bodies* festgestellt werden, die aus ES-Zellen der verschiedenen Systeme hervorgegangen sind. Die Differenzierung der *Embryoid Bodies* erfolgte hier unter statischen „Standardbedingungen“. Interessant wäre hier die Fragestellung, ob eine Differenzierung der *Embryoid Bodies* unter dynamischen Bedingungen einen Einfluss auf das Differenzierungspotential haben könnte.

Abschließend soll noch die Skalierbarkeit der verwendeten dynamischen Suspensionssysteme diskutiert werden. Im Wesentlichen wurden je zwei Arten von gerührten und orbital geschüttelten Systemen untersucht. Zwar konnte eine effizientere Expansion von ES-Zellen in der Spinnerflasche 1, die mit einem Rührpendel ausgestattet war, gegenüber der Spinnerflasche 2 erzielt werden. Allerdings eignet sich die Spinnerflasche 2 mit einer vertikalen Rührerachse einfacher für ein *scale up* des Kultivierungsmaßstabs. Des Weiteren konnte zwar eine sehr gute Proliferation von ES-Zellen im Erlenmeyerkolben beobachtet werden, allerdings ist die Skalierbarkeit dieses Systems auch nur bis zu einem gewissen Maße möglich. Die Anwendung von parallelisierten, zylindrischen CultiFlask 50 Tubes kann hingegen als interessante Alternative betrachtet werden. Während

Medienoptimierungen (z.B. ein Screening nach Zytokinen) und Prozessentwicklungsexperimente im hohen Durchsatz möglich sind, wurde die Skalierbarkeit dieses Systems bereits erfolgreich demonstriert. Wurm *et al.* beschrieben eine 1000-fache Vergrößerung des Kultivierungsmaßstabes von CHO-Suspensionskulturen, wobei CultiFlask 50 Tubes den Ausgangspunkt darstellten<sup>135</sup>. Die Eignung dieses Systems für ein *scale up* von Suspensionskulturen embryonaler Stammzellen muss allerdings noch bewiesen werden. Im Hinblick auf zukünftige Herstellungsprozesse von Stammzellen für klinische Applikationen würden Einweg-Beutelreaktoren, so genannte *disposable bags*, die als *large scale* Derivate von CultiFlask Tubes betrachtet werden können, cGMP Anforderungen entsprechen. Orbital geschüttelte Einweg-Bioreaktoren können gegenwärtig im Maßstab von bis zu 200 Litern erhalten werden. Das SB200-X *orbital shaken bioreactor* System besteht hierbei aus einem geschüttelten Edelstahltank des Herstellers Kühner SA, in den ein Einwegbeutel (Sartorius-Stedim Biotech GmbH) mit integrierter Sensorik (PreSens GmbH) platziert wird<sup>136, 137</sup>.

Nachdem eine erfolgreiche Expansion und Differenzierung von Brachyury ES-Zellen unter Suspensionsbedingungen gezeigt werden konnte, sollte untersucht werden, in wie fern sich diese Kultivierungsbedingungen auf iPS-Zellen übertragen lassen. Während die Adaptation an statische Suspensionsbedingungen im Wesentlichen nach dem gleichen Prinzip erfolgreich verlief, zeigten iPS-Zellen im dynamischen System (Erlenmeyerkolben) eine stark eingeschränkte Proliferation. Dennoch bildeten sich auch hier die charakteristischen Zellsphären aus. Der Einsatz von dynamischen Systemen bedarf demnach einer zusätzlichen „zelltyp-spezifischen“ Optimierung der Kultivierungsparameter und kann dann ebenfalls als Grundlage Bioreaktor basierter Prozesse zur Expansion von iPS-Zellen beitragen.

Zukünftige Arbeiten könnten die Produktion weiterer Stammzell-relevanter Zytokine beinhalten. Beispielsweise fanden Amit *et al.* heraus, dass ein Proteinkomplex bestehend aus dem Zytokin Interleukin-6 (Il-6) und seinem löslichen Rezeptor (Il-6R) bei Suspensionskulturen undifferenzierter humaner ES-Zellen hoch wirksam ist<sup>58</sup>. Eine Produktion der Proteine Il-6 und IL-6R unter Verwendung rekombinanter *E. coli* Stämme wäre denkbar, da eine Glykosylierung scheinbar für die biologische Aktivität nicht zwingend erforderlich ist. Beide Proteine können sowohl aus rekombinanten NS0- (einer Maus Myelom-Zelllinie) als auch aus *E. coli* Kulturen kommerziell erhalten werden (R&D Systems, Thermo Fischer Scientific). Bei der Entwicklung von Expressionsvektoren wäre ferner



überlegenswert, die beiden Proteine getrennt auf zwei Vektoren oder zusammen auf einem Vektor in Form eines Fusionsproteins zu exprimieren, wobei im letzteren Fall eine so genannte „IL6-IL6R-Chimäre“<sup>58</sup> gebildet werden würde.

Bei der Untersuchung von dynamischen Kultivierungssystemen für ES-Zellen wurde gezeigt, dass die Sphärengröße einen kritischen Punkt für die Expansion der Zellen darstellt. Im Hinblick auf zukünftige Weiterentwicklungen von Suspensionsbioreaktoren für ES-Zellen wäre es denkbar, mithilfe der *in-situ* Mikroskopie und des entwickelten bildbearbeitenden Algorithmus zur Größenbestimmung von Zellsphären eine *online*-Beobachtung des Kultivierungsprozesses durchzuführen.

## 6 Anhang

### 6.1 Materialien

#### 6.1.1 *Verbrauchsmaterial*

Material	Typus, Hersteller, Ort
CultiFlask 50 Tubes	Sartorius-Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Einmalhandschuhe	Semperguard, Semperit AG Holding, Wien, Österreich
Einmalpipetten	1, 2, 5 ,10, 25 und 50 ml, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Erlenmeyerkolben	125 ml, 250 ml, VWR International GmbH, Darmstadt
Filterpapiere, Filz pads	Bio-Rad, München
Kryoröhrchen	1,5 ml, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Petrischalen	60- und 94 mm Durchmesser, Greiner Bio One, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Typ A, B, D, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
PVDF Membran	Bio-Rad, München
Reagenz- und Zentrifugen- röhrchen (Falcon Tubes)	15 mL, 50 mL, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Reagiergefäße	1,5 ml, 2 ml, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Spritzen	20 mL, Terumo Europe NV, Leuven, Belgien
Spritzenvorsatzfilter	Minisart 0,2 µm, SartoriusStedim Biotech, Göttingen
Zellkulturflaschen	T 75 Flaschen, T 25 Flaschen, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Zellkulturplatten	96- und 6-Lochplatten, Nunc ThermoFischer, Langenselbold
Zellsiebe	40 µm Ausschlussgröße, BD Biosciences, Heidelberg

#### 6.1.2 *Chemikalien*

Reagenz	Hersteller, Ort
Acrylamid	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Agarose	ABgene, Hamburg
Aminosäuren, nicht essentielle	Gibco, Karlsruhe
Ampicillin	Fluka Chemie AG, Buchs
APS	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Bismethylenacrylamid	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Bromphenolblau	Fluka Chemie AG, Buchs
BSA	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München
Calciumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Chloramphenicol	Fluka Chemie AG, Buchs
Cobaltsulfat	Merck KGaA, Darmstadt
Coomassie PhastGel Blue R	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
DAPI-Lösung	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München
Dithiothreitol	Gibco, Karlsruhe

DMEM high glucose	Gibco, Karlsruhe
DMSO	Merck KGaA, Darmstadt
dNTP's	Fermentas, St. Leon-Rot
EDTA	AppliChem GmbH, Darmstadt
Essigsäure	Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethanol	Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München
Fötale Kälberserum	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Fötale Kälberserum	HyClone, Thermo Fischer, Karlsruhe
Formamid	Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Gelatine, <i>Cell Culture tested</i>	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Glycerin	Fluka Chemie AG, Buchs
Glycin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Hefeextrakt	Fluka Chemie AG, Buchs
HOS	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Imidazol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
IPTG	AppliChem, Darmstadt
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka Chemie AG, Buchs
Kanamycin	Fluka Chemie AG, Buchs
Kupfersulfat	Merck KgaA, Darmstadt
L-Glutamin	Gibco, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck KgaA, Darmstadt
$\beta$ -Mercaptoethanol	Gibco, Karlsruhe
Methanol	Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck KgaA, Darmstadt
Natrium-Pyruvat	Fluka Chemie AG, Buchs
Nickelsulfat	Fluka Chemie AG, Buchs
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München
Penicillin / Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Poly-L-Lysin	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München
Propidiumiodid	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München
RNAse freies Wasser	Qiagen, Hilden
RPMI 1640	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Salzsäure	Fluka Chemie AG, Buchs
Saponin	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München
SDS	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München
TEMED	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München
Trans- $\beta$ -Nitrostyrol	Merck KgaA, Darmstadt
Tris Base	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München
Trypsin	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München
Trypton	Fluka Chemie AG, Buchs

Tween 20	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
Xylencyanol FF	Fluka Chemie AG, Buchs
Zinksulfat	Merck KGaA, Darmstadt

### 6.1.3 *Lösungen und Puffer*

Bezeichnung	Zusammensetzung
Blocklösung	2 % FCS in PBS
Blockpuffer	TBST + 2 % BSA
Breadford-Reagenz	25 mg Coomassie Blue G-250, 12,5 mL 95 % Ethanol, 25 mL 85 % $\text{H}_3\text{PO}_4$ , ad 250 mL $\text{ddH}_2\text{O}$
Coomassie-Entfärberlösung	30 % Essigsäure, 10 % Methanol, 70 % $\text{ddH}_2\text{O}$
Coomassie-Färbelösung	1 PhastGel Blue R Tablette in 80 mL $\text{ddH}_2\text{O}$ + 120 mL Methanol lösen, filtrieren
DAPI-Lösung	Stammlösung (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 1:1000 in 1 x PBS verdünnen.
Essigsäurelösung	5 % (v/v) $\text{CH}_3\text{COOH}$
Fixierungslösung	4 % Paraformaldehyd in Permeabilisierungslösung bei 90°C im Wasserbad ca. 1 h lang lösen
Formaldehydlösung	36,5 % (v/v) $\text{CH}_2\text{O}$
Gelatinelösung	0,1 % in PBS <sup>++</sup>
GFP-Flow Fix Puffer	10,78 g Cacodylsäure, 10 g Paraformaldehyd, 6,65 g NaCl, ad 1 L $\text{ddH}_2\text{O}$ . pH 7,2-7,4 mit NaOH einstellen.
Ladepuffer	95 % Formamid, 0,05 mM EDTA, je 0,025 % SDS, Bromphenolblau, Xylencyanol FF, Ethidiumbromid
Laemmli-Auftragspuffer (LAP)	20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 5 % SDS, (0,02 %) Bromphenolblau, 10% $\beta$ -Mercaptoethanol
Permeabilisierungslösung	0,1 % Saponin in Blocklösung Nach dem Ansetzen wird die Lösung filtriert (0,2 $\mu\text{m}$ Filter)
Natriumcarbonatlösung	2,5 % (w/v) $\text{Na}_2\text{CO}_3$
Phosphate Buffered Saline (PBS)	140 mM NaCl, 27 mM KCl, 7,2 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 14,7 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; pH 7,4
Phosphate Buffered Saline + $\text{Ca}^{2+}$ + $\text{Mg}^{2+}$ (PBS <sup>++</sup> )	PBS mit je 100 mg/ml $\text{CaCl}_2$ und $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
Propidiumiodidlösung	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 0,9 % NaCl
Reduzierlösung	je 1 Spatelspitze $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ und $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ad 100 mL $\text{ddH}_2\text{O}$
Sammelgel (6 %)	731 $\mu\text{l}$ Acrylamid (40 %), 390 $\mu\text{l}$ Bisacrylamid (2 %), 760 $\mu\text{l}$ 1,5 M Tris, 0,3 mL SDS (1 %), 3,82 mL $\text{H}_2\text{O}$ , je 10 $\mu\text{l}$ Temed, APS
Silbernitratlösung	0,1 % (w/v) $\text{AgNO}_3$
TAE Laufpuffer	40 mM Tris Base, 1 mM EDTA, pH 8
TBS Puffer	25 mM Tris, 150 mM NaCl; pH 7,4
TBST (TBS + Tween20)	TBS + 0,05 % Tween 20
1x TGS Laufpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS; pH 8,3
Transferpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin; 10 % Ethanol; pH 8,3
Trenngel (12 %)	2,92 mL Acrylamid (40 %), 1,56 mL Bisacrylamid (2 %), 2,8 mL 1,5 M Tris, 1 mL SDS (1%), 1,76 mL $\text{H}_2\text{O}$ , je 20 $\mu\text{l}$ Temed u. APS

Trypsinlösung 0,2 % Trypsin, pH 7,5 in PBS, 0,02 % EDTA

#### 6.1.4 *Enzyme*

AcTEV Protease, Gibco, Karlsruhe

HotOls DNA-Polymerase, Omni Life Science GmbH, Bremen

M-MLV-Reverse Transkriptase, Promega GmbH, Mannheim

#### 6.1.5 *Zytokine*

NGF (*Nerve growth factor*), Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München

hFGF-2 (*human basic Fibroblast Growth Factor*), Tebu-Bio Peprotech, Offenbach

ESGRO LIF (*murine Leukemia Inhibitory Factor*), Millipore GmbH, Schwalbach

#### 6.1.6 *Antikörper*

Western Blot:

Primärer Antikörper:

*Mouse anti human LIF antibody*, R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt

Sekundärer Antikörper:

*Goat anti mouse secondary antibody conjugated to alkaline phosphatase*, Bio-Rad, München

Durchflusszytometrie:

Firma	Antigen	Fluo-phor	Isotyp	Katalog-Nr.	Konz.	Konz. (µg/µL)	Stamm-lsg.	µL/ Test	µg/ Test
BD	Oct-3/4	PE	Mouse IgG1, κ	560186	0,25µg/20µL	0,0125	/	4	0,05
BD	SSEA-1	FITC	Mouse IgM, κ	560127	0,125µg/20µL	0,00625	/	10	0,0625
BD	E-Cadherin	FITC	Mouse IgG2a, κ	612130	250µg/mL	0,25	/	2	0,5
BD	SSEA-1	PE	Mouse IgM, κ	560142	0,125 µg/20µL	0,00625	/	10	0,0625

Firma	Isotyp-Kontrollen	Fluo-phor	Isotyp	Katalog-Nr.	Konz.	Konz. (µg/µL)	Stamm-lsg.	µL/ Test	µg/ Test
BD		PE	Mouse IgG1, κ	555749	1µg/20 µl	0,05	/	1	0,05
BD		FITC	Mouse IgM, κ	553474	0,5 mg/ml	0,5	50	6,25	0,0625
BD		FITC	Mouse IgG2a, κ	553456	0,5 mg/ml	0,5	/	1	0,5
BD		PE	Mouse IgM, κ	555584	0,5 mg/ml	0,5	50	6,25	0,0625

#### 6.1.7 *Reaktionskits*

RNeasy Plus Mini Kit, Qiagen, Hilden

AP Conjugate Substrate Kit, Bio-Rad, München

FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I, BD Biosciences GmbH, Heidelberg

#### 6.1.8 *Molekulargewichtsmarker*

PageRuler Unstained Protein Ladder SM0661, Fermentas, St. Leon-Rot

PageRuler Prestained Protein Ladder SM0671, Fermentas, St. Leon-Rot

PageRuler Plus Prestained Protein Ladder SM1811, Fermentas, St. Leon-Rot

### **6.1.9      *Chromatographiesäule, Membranadsorber und 8-Strips***

#### **Säule:**

HiTrap™ Heparinsepharose-Säule, 1 ml Bettvolumen, GE Healthcare, Freiburg

#### **Membranadsorber:**

IMAC: Sartobind IDA 75, Sartorius Stedim-Biotech, Göttingen

IEX: Sartobind S 75, Sartorius Stedim-Biotech, Göttingen

#### **8-Strips:**

Vivawell 8-strips IDA-, S- und C-Membran, je 5 Lagen, Sartorius Stedim-Biotech, Göttingen

### **6.1.10      *Spinnerflaschen***

125 ml Spinnerflasche, Integra Biosciences, Fernwald

125 ml Spinnerflasche, Techne Bibby Scientific Ltd., Staffordshire

125 ml Spinnerflasche, Eigenbau TCI Werkstatt, Hannover

## **6.2 Geräte**

Gerät	Typus, Hersteller, Ort
Autoklav	Systec V-150, Systec GmbH, Wettenberg
Biochemischer Analysator	YSI Select™, YSI Incorporated, Yellow Springs, USA
Brutschrank Zellkultur	Heracell 240, Heraeus Holding GmbH, Hanau
Brutschrank Mikrobiologie	CertomatR HK, B. Braun Biotech, Melsungen
Digitalkamera	Zellfotos: Olympus Camedia C-4040 Zoom, Olympus Corporation, Puchheim
Durchflusszytometer	Epics XL/MCL Beckman Coulter, Krefeld
Elektrophoresekammer (SDS Gel)	Mini Protean Tetra Cell , Bio-Rad, München
Elektrophoresekammer (Agarosegel)	Thermo Fischer Scientific, Bonn
Endotoxin Messgerät	Endosafe® PTSTM, Charles River, Boston, USA
Feinwaage	MC 1, Sartorius-Stedim Biotech, Göttingen
Geldokumentation	Gel IX Imager, Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Hochdruckhomogenisator	M-110L, Microfluidics, Newton, USA
Lichtmikroskop	Axiopot, Carl Zeiss AG, Oberkochen
Magnetrührer	RCT b, IKA Werke GmbH, Staufen
PCR-Thermocycler	Px2 Thermal Cycler, Thermo Electron Corporation, Waltham, USA
Fluoreszenzmikroskop	Zellfotos: Olympus IX 50, Olympus Corporation, Tokio, Japan
FPLC	BioLogic Duo-Flow Systems, Bio-Rad, München

Orbitalschüttler Zellkultur	DOS-10M Elmi Skyline, Elmi Ltd., Riga, Lettland
pH-Elektrode	Checker®, Hanna Instruments Ltd, Leighton Buzzard, Großbritannien
Pipetten	Research®, Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe	Pipetus®, Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co KG, Eberstadt
Plattenlesegerät	Microplate Reader 680, Bio-Rad, München
Schüttler für Färbungen, Blots	MTS 4, IKA Werke GmbH, Staufen
Sterilbänke	Technoflow 2F150-II GS, Integra Biosciences AG, Zürich, Schweiz HERAsafe KS, Kendro Laboratory Prod., Boston, USA
Trans-Blot-Zellkammer	Criterion Blotter, Bio-Rad, München
Thermomixer	Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg
Ultraschallgerät	Labsonic, Sartorius-Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex Super RK 510 H, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin
UV/Vis-Spektralphotometer	NanoDrop ND-1000, PEQLAB -Biotechnologie GmbH, Erlangen
Vortex-Mixer	VM-300, NeoLab Migge GmbH, Heidelberg
Wasseraufbereitungsanlage	Arium 611, Sartorius-Stedim Biotech, Göttingen
Zählkammer (nach Neubauer)	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Zentrifuge für 1,5 und 2 ml Reagiergefäße	Centrifuge 5415 R, Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge für Falkontubes und Mikrotiterplatten:	Megafuge 1.0 RS, Heraeus Instruments GmbH, Osterode

### 6.3 Bakterienstämme

Zur hFGF-2-Produktion wurde der bereits transformierte Stamm *E. coli* BL21(DE3)-pET29c-hFGF-2 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Rinas) verwendet.

Zur hLIF-Produktion wurde ebenfalls ein *E. coli* BL21(DE3) Stamm (Novagen, Darmstadt) verwendet, der mit dem eigens konstruierten Vektor pET32b-trx-his-tev-hLIF transformiert wurde.

Zur Produktion der TEV-Protease wurde der Stamm *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS-pTH24:TEV mit dem Expressionsvektor eingesetzt. Der Rosetta *E. coli* Stamm kompensiert über das Vorhandensein des pLysS-Plasmids für eine Reihe in *E. coli* selten vorkommender tRNAs.

## 6.4 Expressionsvektoren

### **pET29c-hFGF-2**

Zur Expression von hFGF-2 wurde der Vektor pET29c-hFGF-2 verwendet. Er enthält eine synthetische hFGF-2 cDNA<sup>107</sup> unter der Kontrolle eines mit IPTG induzierbaren T7 Promoters sowie eine Kanamycin-Resistenz.

### **pET32b-trx-his-tev-hLIF**

Das hLIF-Fusionsprotein wurde vom pET32b-trx-his-tev-hLIF Expressionsvektor kodiert, der in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Dr. Axel Schambach (Institut für Experimentelle Hämatologie, MHH) für diesen Zweck konstruiert wurde. Durch einen Lac-Operator ist die Proteinexpression mittels IPTG induzierbar. Der Vektor enthält außerdem ein Gen für Ampicillin-Resistenz als Selektionsmarker. Die Sequenz des offenen Leserahmens des Fusionskonstruktes ist in Abbildung 6.1 zu sehen.

### **pTH24:TEV**

Als Expressionsvektor für die TEV-Protease wurde der pTH24:TEV Vektor verwendet, der freundlicherweise von Helena Berglund (Abteilung Medizinische Biochemie und Biophysik des Karolinska Instituts in Stockholm, Schweden) bzw. von Frau Dr. Ursula Rinas vom HZI in Braunschweig zur Verfügung gestellt wurde. Er trägt das Gen für eine hoch lösliche Mutante der TEV-Protease, die von van den Berg *et al.* erzeugt wurde und die Bezeichnung TEVSH trägt<sup>130</sup>. Die Expression des auf dem pTH24:TEV Vektor liegenden Zielproteins ist über einen Lac-Operator möglich. Auch hier ist eine Aufreinigung über eine His-Markierung möglich. Das Plasmid trägt außerdem ein Gen für Ampicillin-Resistenz als Selektionsmarker.



```

1  atgagcgataaaattattcacctgactgacgacagttttgacacggatgtactcaaagcg
   m s d k i i h l t d d s f d t d v l k a
>>.....TRX.....>

61  gacggggcgatcctcgtcgatttctgggcagagtgggtgcggtccgtgcaaaatgatcgcc
   d g a i l v d f w a e w c g p c k m l a
>.....TRX.....>

121 ccgattctggatgaaatcgctgacgaatatcagggcaaactgaccgttgcaaaactgaac
   p i l d e i a d e y q g k l t v a k l n
>.....TRX.....>

181 atcgatcaaaaccctggcactgcgccgaaatatggcatccgtgggtatcccgactctgctg
   i d q n p g t a p k y g i r g i p t l l
>.....TRX.....>

241 ctgttcaaaaacggtgaagtggcggcaaccaagtgggtgcactgtctaaagggtcagttg
   l f k n g e v a a t k v g a l s k g q l
>.....TRX.....>

301 aaagagttcctcgacgctaacctggccggttctggttctggccatatgcaccatcatcat
   k e f l d a n l a g s g s g h m h h h h
>.....TRX.....>> >>..His -..>

361 catcattcttctggtgagaatctttatcttcagggtatccctctctcccatcaccctgtc
   h h s s g e n l y f q g s p l p i t p v
tag.>> >>.....TEV.....>> >>.....hLIF.....>

421 aacgccacctgtgccatacggccacccatgtcacacaacctcatgaaccagatcaggagc
   n a t c a i r h p c h n n l m n q i r s
>.....hLIF.....>

481 caactggcacagctcaatggcagtgccaatgcctctttattctctattacacagcccag
   q l a q l n g s a n a l f i l y y t a q
>.....hLIF.....>

541 ggggagccgttccccaacaacctggacaagctatgtggccccaacgtgacggacttcccg
   g e p f p n n l d k l c g p n v t d f p
>.....hLIF.....>

601 cccttccacgccaacggcacggagaaggccaagctggtggagctgtaccgcatagtcgtg
   p f h a n g t e k a k l v e l y r i v v
>.....hLIF.....>

661 taccttggcacctccctgggcaacatcacccgggaccagaagatcctcaacccacgtgcc
   y l g t s l g n i t r d q k i l n p s a
>.....hLIF.....>

721 ctacgctccacagcaagctcaacgccaccgccgacatcctgagaggcctccttagcaac
   l s l h s k l n a t a d i l r g l l s n
>.....hLIF.....>

781 gtgctgtgccgcctgtgcagcaagtaccacgtgggcatgtggacgtgacctacggccct
   v l c r l c s k y h v g h v d v t y g p
>.....hLIF.....>

841 gacacctcgggtaaggatgtcttccagaagaagaagctgggctgtcaactcctggggaag
   d t s g k d v f q k k k l g c q l l g k
>.....hLIF.....>

901 tataagcagatcatcgccgtgttgcccaggccttctag
   y k q i i a v l a q a f -
>..... hLIF .....>>

```

Abbildung 6.1 DNA- Sequenz (jeweils obere, nummerierte Zeilen) und entsprechende Aminosäureabfolgen des trx-his-tev-hLIF-Fusionsproteins. Die hLIF kodierende DNA-Sequenz ist fett markiert.

## 6.5 Zelllinien

### PC-12 (Rat Adrenal Pheochromocytoma)

Die Zelllinie wurde aus einem Phäochromocytom der Nebenniere einer Ratte etabliert<sup>113</sup>.

### NIH-3T3 (Swiss Mouse Embryo)

Die Zelllinie wurde aus primären Mausembryo-Fibroblasten durch Transfektion mit onkogenen Viren entwickelt<sup>138</sup>.

Diese beiden Zelllinien wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen.

### Murine ES-Zelllinie Brachyury

Die murine ES-Zelllinie E14.1, isoliert aus dem Mausstamm 129/Ola, erlaubt aufgrund eines eGFP-Transgens im brachyury-Lokus das Nachverfolgen der Mesoderm-Induktion im Verlauf der Differenzierung<sup>134</sup>.

### Murine iPS-Zelllinie YM100 (Klon „M15“)

Die iPS-Zelllinie YM100 wurde generiert aus reprogrammierten murinen OG2-Fibroblasten<sup>127</sup> und enthält ein GFP-Reporterprotein unter der Kontrolle des endogenen Oct-3/4 Promoters.

Beide Stammzelllinien wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Ulrich Martin (Klinik für Herz-, Thorax-, Transplantations- und Gefäßchirurgie (HTTG), Medizinische Hochschule Hannover) zur Verfügung gestellt

## 6.6 Methoden

### 6.6.1 *Arbeiten mit rekombinanten E. coli Stämmen*

#### 6.6.1.1 Medien und Zusätze

M9-Medium: Komponente	Menge (g/l)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,782
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3
NaCl	0,5
NH <sub>4</sub> Cl	2,5
Glucose	10
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	1,2
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,0147
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,0028
MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	0,002
CoSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,0028
CuCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,0002
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,0003

**LB-Medium:** Je 10 g Trypton und NaCl, 5 g Hefeextrakt, 1000 ml ddH<sub>2</sub>O

**TB-Medium:** Lösung 1: 12 g Trypton, 24 g Hefeextrakt, 4 ml Glycerin (100%), 900 ml ddH<sub>2</sub>O,  
Lösung 2: 2,31 g (0,17 M) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 12,54 g (2,31 M) K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 ml ddH<sub>2</sub>O

**Antibiotika:** Kanamycin 34 µg/ ml, Chloramphenicol 34 µg/ ml, Ampicillin 75 µg/ml

#### 6.6.1.2 *E. coli* Kultivierung und Expression von rekombinanten Proteinen

Die Kultivierungen zur Expression der rekombinanten Proteine werden im 100 ml-Maßstab durchgeführt. Dazu werden am Vortag der Expression Vorkulturen in 20 ml antibiotikaversetztem Medium angesetzt. Diese werden über Nacht bei 37 °C und 130 rpm im Schikanekolben inkubiert. Die Hauptkultur wird aus 100 ml antibiotaversetztem LB- oder TB-Medium und 1 ml-2 ml der Vorkultur angesetzt und zunächst bei 37 °C und 130 rpm bis zu einer optischen Dichte (O.D.) von 0,6 bzw 1,7 im Schikanekolben inkubiert. Dann wird die Expression der Zielproteine durch Zugabe von IPTG induziert. Die Ernte erfolgt bei variablen Zelldichten bei O.D.-Werten zwischen 1,2 und 18. Dafür wird die Kulturbrühe in 50 ml-Falcon-Tubes überführt und bei 4000 g zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und das Zellpellet entweder bei -20°C eingefroren oder direkt aufgearbeitet.

### **6.6.1.3 Zellaufschluss von *E. coli***

Für den Zellaufschluss werden die Zellpellets mit dem jeweiligen Bindungspuffer der anschließend durchgeführten chromatographischen Aufreinigung auf eine O.D. von 10 resuspendiert.

#### **Zellaufschluss per Ultraschall**

Bei Probenvolumina bis zu 10 ml wird der Zellaufschluss per Ultraschall durchgeführt. Die Zellsuspension wird dafür mit einer Pulsdauer von 1 s bei 100 W dreimal für eine Minute auf Eis mit Ultraschall behandelt. Dazwischen wird sie jeweils eine Minute auf Eis abgekühlt.

#### **Zellaufschluss per Hochdruckhomogenisator (*FrenchPress*)**

Bei größeren Probenvolumina wird der Hochdruckhomogenisator für den Zellaufschluss verwendet. Die eisgekühlten Proben werden hierfür fünfmal unter Hochdruck durch eine Keramikmembran gepresst und dadurch aufgeschlossen.

#### **Trennung von unlöslichen und löslichen Zellfraktionen**

Zur Abtrennung von unlöslichen Proteinen und Zelltrümmern aus dem aufgeschlossenen Zellysate wird die Probe bei 4°C und 17.000 g für 30 min zentrifugiert. Der Überstand (die lösliche Proteinfraction) wird vom sedimentierten Pellet mit unlöslichen Proteinen getrennt und gesammelt. Das Zellpellet kann, je nach Versuch, zu Untersuchungen der unlöslichen Fraction in Bindungspuffer resuspendiert werden. Um unlösliche Proteine in Lösung zu überführen, wird SDS-enthaltender Probenpuffer hinzugegeben.

### 6.6.2 *Proteinaufreinigung über Vivawell 8-Strips*

8-Strips bestehen aus bis zu acht nebeneinander angeordneten Membranadsorbereinheiten und werden über einen Lochrahmen mit 96-Lochplatten kombiniert. So können Proteingemische unter Verwendung einer Zentrifuge getrennt werden. Dabei kommt folgendes Protokoll zum Einsatz:

#### 1. Beladen der Membran mit Metallionen

- Die Membranen werden mit 300 µL Äquilibrationpuffer gewaschen und 3 min bei 500 g zentrifugiert
- Membranen werden zwei mal mit je 300 µL Metall-Salz-Lösung beladen und jeweils 3 min bei 500 g zentrifugiert
- Um ungebundene Metallionen zu entfernen werden die Membranen zwei mal mit je 300 µL Äquilibrationpuffer gewaschen und jeweils 3 min bei 500 g zentrifugiert
- Zum Äquilibrieren werden die Membranen zwei mal mit je 300 µL Bindungspuffer gewaschen und jeweils 3 min bei 500 g zentrifugiert

#### 2. Aufreinigung des His-Tag-Proteins

- Zur Proteinbeladung werden drei mal je 300 µL filtrierte Proteinprobe auf die Membran gegeben und jeweils 3 min bei 500 g zentrifugiert (Durchbruchfraktionen d)
- Zur Entfernung unspezifisch gebundener Proteine wird zweimal mit je 300 µL Bindungspuffer gewaschen und je 3 min bei 500 g zentrifugiert (Waschfraktionen w<sub>1</sub>, w<sub>2</sub>).
- Das Protein wird mit den entsprechenden Elutionspuffern in drei Stufen eluiert, indem jeweils 3 min bei 500 g zentrifugiert wird (Elutionsfraktionen e<sub>1</sub>, e<sub>2</sub>, e<sub>3</sub>).

#### Metall-Salz-Lösungen

Ni <sup>2+</sup> :	0,5 M Nickelsulfat	(NiSO <sub>4</sub> · 6 H <sub>2</sub> O) in Äquilibrationpuffer
Co <sup>2+</sup> :	0,5 M Cobaltchlorid	(CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O) in Äquilibrationpuffer
Cu <sup>2+</sup> :	0,5 M Kupfersulfat	(CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O) in Äquilibrationpuffer
Zn <sup>2+</sup> :	0,5 M Zinksulfat	(ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O) in Äquilibrationpuffer

#### Äquilibrationpuffer

100 mM NaAc, pH 4,5  
500 mM NaCl

#### Bindungspuffer

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8  
500 mM NaCl

#### Elutionspuffer e<sub>1</sub>

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,5  
500 mM NaCl  
100 Imidazol

#### Elutionspuffer e<sub>2</sub> und e<sub>3</sub>

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,5  
500 mM NaCl  
250 mM Imidazol

### 6.6.3 *Proteinaufreinigung mittels FPLC*

FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) beschreibt ein Gerätesystem für die chromatographische Trennung von Substanzen, welches ursprünglich speziell für die Protein-Reinigung entwickelt wurde. Beim FPLC-System wird unter vergleichsweise geringen Drücken gearbeitet. Zur Detektion der aufgereinigten Proteine kann z.B. ein UV Detektor eingesetzt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Reinigung von Proteinen folgende Protokolle verwendet:

Festgelegte Parameter:      Lampe des UV-Detektors: An  
    Zero Baseline des UV-Detektors

#### Aufreinigung von hFGF-2 mittels Kationenaustauschchromatographie

Step	Zustand des Systems	Parameter		Volumen/Flussrate
1	Isocratic Flow	A: A-Buffer 1 B: Buffer B	100% 0%	Volume: 5 mL Flow: 1.00 mL/min
2	Load/Inject Sample	Load: Sample Direct Inject	Auto Inject Valve	Volume: 10 mL Flow: 1.00 mL/min
3	Isocratic Flow	A: A-Buffer 1 B: Buffer B	100% 0%	Volume: 5 mL Flow: 1.00 mL/min
4	Linear Gradient	A: A-Buffer 1 B: B-Buffer 1	0% 100%	Volume: 15 mL Flow: 1.00 mL/min
5	Isocratic Flow	A: A-Buffer 1 B: B-Buffer 1	0% 100%	Volume: 5 mL Flow: 1.00 mL/min
8	End of Protocol			

A-Buffer 1: 25 mM NaPHO<sub>4</sub>, pH 7,5

B-Buffer 1: 25 mM NaPHO<sub>4</sub>, pH 7,5 + 1 M NaCl

#### Aufreinigung von hFGF-2 mittels Heparinaffinitätschromatographie

Step	Zustand des Systems	Parameter		Volumen/Flussrate
1	Isocratic Flow	A: A-Buffer 1 B: Buffer B	100% 0%	Volume: 5 mL Flow: 1.00 mL/min
2	Load/Inject Sample	Load: Sample Direct Inject	Auto Inject Valve	Volume: 11 mL Flow: 1.00 mL/min
3	Isocratic Flow	A: A-Buffer 1	100%	Volume: 10 mL

		B: Buffer B	0%	Flow: 1.00 mL/min
4	Linear Gradient	A: A-Buffer 1 B: B-Buffer 1	0% 100%	Volume: 15 mL Flow: 1.00 mL/min
5	Isocratic Flow	A: A-Buffer 1 B: B-Buffer 1	0% 100%	Volume: 5 mL Flow: 1.00 mL/min
8	End of Protocol			

A-Buffer 1: 25 mM NaPHO<sub>4</sub>, pH 7,5

B-Buffer 1: 25 mM NaPHO<sub>4</sub>, pH 7,5 + 2,5 M NaCl

### Aufreinigung von hLIF mittels IMAC

Um die Membran mit Metallsalz zu beladen wird zunächst 10 ml Äquilibriumspuffer mit einer Flussrate von 1 ml/min über die Membran geleitet. Daraufhin wird 10 ml Zn<sup>2+</sup>-Lösung über die Membran geleitet und nachfolgend mit mindestens 20 ml Äquilibriumspuffer gespült bis die Leitfähigkeit ihren Ursprungswert erreicht.

Step	Zustand des Systems	Parameter		Volumen/Flussrate
1	Isocratic Flow	A: A-Buffer 1 B: Buffer B	100% 0%	Volume: 5 mL Flow: 1.00 mL/min
2	Load/Inject Sample	Loade: Sample Direct Inject	Auto Inject Valve	Volume: 10 mL Flow: 1.00 mL/min
3	Isocratic Flow	A: A-Buffer 1 B: Buffer B	100% 0%	Volume: 10 mL Flow: 1.00 mL/min
4	Isocratic Flow	A: A-Buffer 2 B: Buffer B	100% 0%	Volume: 10 mL Flow: 1.00 mL/min
5	Isocratic Flow	A: A-Buffer 3 B: Buffer B	100% 0%	Volume: 5 mL Flow: 1.00 mL/min
6	Isocratic Flow	A: A-Buffer 4 B: Buffer B	100% 0%	Volume: 15 mL Flow: 1.00 mL/min
7	Isocratic Flow	A: A-Buffer 1 B: Buffer B	100% 0%	Volume: 10 mL Flow: 1.00 mL/min
8	End of Protocol			

A-Buffer 1: Bindungspuffer, NaPHO<sub>4</sub>, pH 8, 500 mM NaCl

A-Buffer 2: Waschpuffer, 50 mM Tris-HCl, pH 8, 100 mM NaCl

A-Buffer 3: Elutionspuffer 1, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM Imidazol

A-Buffer 4: Elutionspuffer 2, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 250 mM Imidazol

### Aufreinigung von hLIF mittels Kationenaustauschchromatographie

Step	Zustand des Systems	Parameter		Volumen/Flussrate
1	Isocratic Flow	A: A-Buffer 1 B: Buffer B	100% 0%	Volume: 5 mL Flow: 1.00 mL/min
2	Load/Inject Sample	Loade: Sample Direct Inject	Auto Inject Valve	Volume: 15 mL Flow: 1.00 mL/min
3	Isocratic Flow	A: A-Buffer 1 B: Buffer B	100% 0%	Volume: 10 mL Flow: 1.00 mL/min
4	Isocratic Flow	A: A-Buffer 2 B: Buffer B	100% 0%	Volume: 15 mL Flow: 1.00 mL/min
8	End of Protocol			

A-Buffer 1: Bindungspuffer, 50 mM Tris-HCl; pH 7,0, 100 mM NaCl

A-Buffer 2: Elutionspuffer, 50 mM Tris-HCl, pH 7,25, 1000 mM NaCl

### Aufreinigung von TEV-Protease mittels IMAC

Um die Membran mit Metallsalz zu beladen wird zunächst 10 ml Äquilibrationpuffer mit einer Flussrate von 1 ml/min über die Membran geleitet. Daraufhin wird 10 ml  $\text{Zn}^{2+}$ -Lösung über die Membran geleitet und nachfolgend mit mindestens 20 ml Äquilibrationpuffer gespült bis die Leitfähigkeit ihren Ursprungswert erreicht.

Step	Zustand des Systems	Parameter		Volumen/Flussrate
1	Isocratic Flow	A: A-Buffer 1 B: Buffer B	100% 0%	Volume: 5 mL Flow: 1.00 mL/min
2	Load/Inject Sample	Loade: Sample Direct Inject	Auto Inject Valve	Volume: 10 mL Flow: 1.00 mL/min
3	Isocratic Flow	A: A-Buffer 1 B: Buffer B	100% 0%	Volume: 10 mL Flow: 1.00 mL/min
4	Isocratic Flow	A: A-Buffer 2 B: Buffer B	100% 0%	Volume: 10 mL Flow: 2.00 mL/min
5	Isocratic Flow	A: A-Buffer 3 B: Buffer B	100% 0%	Volume: 10 mL Flow: 1.00 mL/min



6	Isocratic Flow	A: A-Buffer 4 B: Buffer B	100% 0%	Volume: 15 mL Flow: 1.00 mL/min
7	Isocratic Flow	A: A-Buffer 1 B: Buffer B	100% 0%	Volume: 10 mL Flow: 1.00 mL/min
8	End of Protocol			

A-Buffer 1: Bindungspuffer, 50 mM Tris-HCl; pH 8,0, 500 mM NaCl

A-Buffer 2: Waschpuffer, 50 mM Tris-HCl; pH 7,0, 100 mM NaCl

A-Buffer 3: Vorelutionspuffer 50 mM Tris-HCl; pH 7,5, 100 mM NaCl, 100 mM Imidazol

A-Buffer 4: Elutionspuffer 50 mM Tris-HCl; pH 7,5, 100 mM NaCl, 250 mM Imidazol, in 50 % Glycerin

Alle FPLC-Läufe werden über einen UV/Vis-Detektor sowie durch Messung der Leitfähigkeit verfolgt. Die Software BioLogic DuoFlow (BioRad) erstellt dabei die Spektren der Absorptions- sowie Leitfähigkeitsmessungen.

#### **Regenerierung und Lagerung der IDA 75-Membran**

Zur Entfernung der Metallionen von der Membran wird die Membran mit 1 N Schwefelsäure gespült. Dazu werden 10 ml Schwefelsäure über die Membran gegeben und nachfolgend mit mindestens 20 ml Äquilibrationpuffer gespült, bis die Leitfähigkeit abnimmt und über längere Zeit konstant bleibt. Die Membran wird in Äquilibrationpuffer mit 0,02 % Natriumazid bei 4°C gelagert.

#### **Regenerierung und Lagerung der S 75-Membranen und der Heparinsepharosesäule**

Die Membran bzw. Säule wird mit 20 % Ethanol gespült und darin bei 4°C gelagert.

#### **6.6.4 Proteinbestimmung in Lösung nach Bradford**

Bei der Methode nach Bradford wird die Proteinkonzentration durch den Farbstoff Coomassie Blue bestimmt. Der Farbstoff bindet an basische Aminosäuren, wodurch das Absorptionsspektrum einer Probe in den Wellenlängenbereich von 595 nm verschoben wird. Für den Bradford-Test im Mikrotiterplattenmaßstab wurden 10 µL Proteinlösung und 300 µL Bradford-Reagenz eingesetzt. Als Referenzprotein wurde BSA im Konzentrationsbereich von 0 bis 500 µg / mL verwendet. Die Proben werden vor Beginn der Messung für 30 s geschüttelt und anschließend 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der Absorption bei 595 nm erfolgt im automatisierten Modus am Spektralphotometer unter Verwendung der

Software SkanIt (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe).

#### **6.6.5      *Proteinbestimmung im Gel über Densitometrie***

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in imidazolhaltigen Lösungen, bei denen eine Analyse über Absorption im UV-Bereich oder durch klassische Methoden der Proteinkonzentrationsbestimmung nicht möglich ist, kann die Proteinbestimmung densitometrisch an einem gefärbten SDS-Gel durchgeführt werden. Dazu wird ein SDS-Gel mit den zu untersuchenden Proben und einer Standardreihe von BSA-Lösungen im Konzentrationsbereich von 100 bis 500 µg / mL aufgetragen und anschließend mit Coomassie Blue G-250 gefärbt. Aus der Farbintensität der Banden kann zunächst über die BSA-Proben eine Kalibriergerade erstellt werden, woraus die Proteinkonzentration bestimmt wird. Zur Bestimmung der Bandenintensitäten wurde die Software AlphaEaseFC Stand alone (Innotech, Oldendorf) verwendet.

#### **6.6.6      *Proteolytische Spaltung mittels TEV-Protease***

Die proteolytische Spaltung des hLIF-Fusionsproteins wird über Nacht bei 4°C durchgeführt. Als Puffersystem wird 50 mM Tris-HCl mit 2,5 mM EDTA bei pH 7,5 gewählt. Vor dem Verdau werden die Fraktionen mit hLIF-Fusionsprotein nach der IMAC gesammelt und vereinigt, und der Proteingehalt densitometrisch bestimmt. Bevor die TEV-Protease zugegeben wird, wird das Puffersystem durch entsprechende Zugabe eines 20-fach konzentrierten Probenpuffers eingestellt. Der Verdau wird durch Zugabe der TEV-Protease im Massenverhältnis 1:10 (TEV:hLIF-Fusionsprotein) gestartet. Der zeitliche Verlauf der Spaltung kann mittels SDS PAGE und Silberfärbung verfolgt werden.

#### **6.6.7      *SDS PAGE und Western Blot***

##### **SDS Polyacrylamidgelelektrophorese:**

SDS denaturiert die Proteine, so dass sie in Kettenform vorliegen, und gleicht deren Ladungen einander an, wodurch eine Auftrennung der Größe nach möglich wird. Die Analyse der Proben auf Gehalt an Zielprotein wird mittels 12 %-iger (w/v) SDS-Polyacrylamid-Trenngele, die mit 6 %-igen (w/v) Laufgelen überschichtet werden,

durchgeführt. Die PAGE erfolgt in einem diskontinuierlichen Laemmli-System mit Tris-Glycin-SDS-Laufpuffer. Zur Vorbereitung werden die Proben im Verhältnis 1:1 mit Laemmli-Auftragspuffer versetzt und für 5 min bei 95°C im Wärmeblock denaturiert. Anschließend werden die Proben bei maximaler Zentrifugendrehzahl für 30 s zentrifugiert, um eventuell gebildetes Präzipitat zu sedimentieren. Anschließend werden die Proben vollständig in die Geltaschen überführt und zusammen mit einem Molekulargewichtsmarker elektrophoretisch aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgt zunächst bei einer Spannung von 100 V, bis sich die Proben zu einer schmalen Bande gesammelt haben. Dann wird die Spannung auf 150 V erhöht. Die Elektrophorese ist beendet, wenn der im Laemmli-Puffer enthaltene Farbstoff Bromphenolblau das Gel gerade verlassen hat. Die Visualisierung der Proteine erfolgt mittels Coomassie- oder Silberfärbung.

### **Coomassie-Färbung:**

Zur Färbung von SDS Gelen mit Coomassie werden die Gele unter Schwenken für ca. 1 h bei Raumtemperatur in der Färbelösung inkubiert. Anschließend wird unspezifisch ins Gel eingelagerter Farbstoff mit einer Entfärberlösung ausgewaschen. Der Vorgang wird bis zu einer vollständigen Entfärbung des Hintergrundes durchgeführt.

### **Silberfärbung**

Für die Silberfärbung wird das Gel bei Raumtemperatur für 30 min unter Schwenken mit Entfärber / Fixierer inkubiert und anschließend zweimal kurz mit Wasser gewaschen. Dann wird für 2,5 min mit Reduzierlösung unter Schwenken inkubiert und anschließend das Gel solange mit Wasser gewaschen, bis es vollständig entfärbt ist. Dann wird das Gel 30 min lang mit frisch angesetzter Silbersalzlösung versetzt. Anschließend folgt ein Waschschriff mit Wasser und mit Natriumcarbonatlösung. Zum Entwickeln wird das Gel in 100 ml Natriumcarbonatlösung und mit 300 µL Formaldehydlösung bis zur gewünschten Färbung inkubiert. Die Färbung wird durch zehnminütiges Schwenken in 5 % Essigsäure gestoppt.

### **Western Blot**

Beim Blotting-Verfahren können Biomoleküle (DNA, RNA und Proteine) nach gelelektrophoretischer Auftrennung auf eine Membran transferiert und immobilisiert werden. Der Transfer von Proteinen wird als Western Blot bezeichnet. Die Proteine können dann auf der Membran durch die spezifische Bindung von Antikörpern identifiziert werden

(Immunodetektion). Die Prozedur des Western Blots wird aus Gründen der Übersichtlichkeit stichpunktartig erläutert:

- Kurzes Waschen der PVDF-Membran in unvergälltem Ethanol
- Das SDS Gel, die Membran, 2 Filterpapiere und 2 Filz pads getrennt von einander in Transferpuffer schwenken
- Die Trans-Blot-Zellkammer mit dem Transferpuffer füllen
- Der Proteintransfer dauert 60 min. bei 100 V und 150 mA und findet unter Kühlung statt.
- Die Membran wird daraufhin wie folgt behandelt:
- 1 h lang in Blockpuffer schwenken
- Inkubation (1 h) in der primären Antikörperlösung (1:1500 in Blockpuffer)
- 3 x für jeweils 5 min. mit Blockpuffer waschen
- Inkubation (1 h) in der sekundären Antikörperlösung (1:3000 in TBST)
- Je 3 x für 5 min mit TBST und je 2 x für 10 min. mit TBS waschen
- 5 min. mit 1 x AP-Puffer\* waschen.
- Die Farbentwicklungslösung wird aus 25 ml 1 x AP-Puffer, und je 0,25 ml Farbreagenz A\* und B\* hergestellt und auf die Membran gegeben. Diese wird in der Farbentwicklungslösung geschwenkt, bis rot-lila gefärbte Banden sichtbar werden.
- Die Färbung wird mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  gestoppt und die Membran an der Luft getrocknet.

\* enthalten im AP Conjugate Substrate Kit, Bio-Rad

## **6.6.8            *Arbeiten mit Zellkulturen***

### **6.6.8.1           Medien und Zusätze**

#### **Für PC-12 Zellen:**

Nährmedium:

RPMI-1640 Medium + 5 % fötales Kälberserum (FCS, PAA), 10 % Pferdeserum (HOS, PAA), 1 % L-Glutamin, 1 % Penicillin / Streptomycin, 1 % Natrium-Pyruvat

Differenzierungsmedium:

RPMI-1640 Medium + 1 % FCS, 1 % HOS, 1 % L-Glutamin, 1 % Penicillin / Streptomycin, 1 % Natrium-Pyruvat, 100 ng /ml NGF bzw. 100 ng /ml FGF-2

#### **Für NIH-3T3 Zellen:**

Nährmedium:

DMEM Medium + 15 % FCS (PAA) + 1 % Penicillin / Streptomycin

Zur Testung von hFGF-2 wird das Zytokin (produziertes und kommerziell erhältliches) in Konzentrationen von 0-50 ng / ml hinzugefügt.

#### **Für Brachyury ES-Zellen und iPS-Zellen YM100:**

Expansionsmedium:

DMEM Medium + 15 % FCS (HyClone) + 1 % Penicillin / Streptomycin, 0,2 mM L-Glutamin, 0,2 mM nicht-essentielle Aminosäuren, 0,1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 1000 units / ml (10 ng/ml) ESGRO LIF bzw. produziertes hLIF.

Differenzierungsmedium:

DMEM Medium + 15 % FCS + 1 % Penicillin / Streptomycin, 0,2 mM L-Glutamin, 0,2 mM nicht-essentielle Aminosäuren, 0,1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol

#### **Kryomedium:**

Jewiliges Nähr- bzw Expansionsmedium + 10 % FCS + 10 % DMSO

#### **Beschichtung der Zellkulturoberflächen mit Gelatine für Differenzierungskulturen von ES- und iPS-Zellen**

Die Beschichtung der Plastikoberflächen von 6-Lochplatten erfolgt kurz vor der Versuchsdurchführung und wird unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Dazu wird eine sterile 0,1 % ige Lösung von Gelatine in PBS<sup>++</sup> hergestellt und bis zur jeweiligen Verwendung

bei 4°C gelagert. Zur Bedeckung der Oberfläche einer 6-Lochplatte wird pro Kavität 1 ml der hergestellten Gelatinelösung verwendet. Die Platten werden für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wird überschüssige Gelatine entfernt und die Oberflächen getrocknet, indem die Lochplatten mindestens weitere 30 min offen unter der Sterilwerkbank gelagert werden.

### **6.6.8.2 Kultivierung und Subkultivierung von PC-12 und NIH-3T3 Zellen**

Die Zellen werden bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit in T 75 Flaschen (75 cm<sup>2</sup>) kultiviert. (Da PC-12 Zellen dazu neigen, während des Wachstums Zellklumpen zu bilden, werden die Zellkulturoberflächen mit PLL beschichtet, was zu einer besseren und gleichmäßigeren Adhärenz der Zellen führt). Bei Erreichen der Konfluenz wird eine Passage durchgeführt. Dazu wird das Zellkulturmedium vollständig abgesaugt und der Zellrasen einmal mit 1x PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit 2 ml Trypsin für 2-5 min bei Raumtemperatur (PC-12) bzw. bei 37°C (NIH-3T3) inkubiert. Durch kräftiges Klopfen an die Flaschenwand werden die Zellen zusätzlich mechanisch vom Flaschenboden abgelöst. Die Enzymaktivität des Trypsins wird durch Zusatz von 4 ml Nährmedium gestoppt. Nun werden die Zellen mit einer sterilen 10 ml Einmalpipette vereinzelt, indem das Medium mehrmals hoch-und heruntergesogen wird. Anschließend wird die Zellsuspension in ein 50 ml Falcontube überführt und das Vereinzeln wird mit einer 1 ml-Eppendorfpipette wiederholt. Dann werden 2 ml der Zellsuspension (1/3 des Gesamtvolumens) in eine neue, (im Fall der PC-12 Zellen mit Poly-L-Lysin beschichtete) T 75 Flasche ausgesät. Als letztes werden nochmals ca. 20 ml Nährmedium dazugegeben.

### **6.6.8.3 Kultivierung und Subkultivierung von ES-Zellen und iPS-Zellen**

Undifferenzierte Stammzellen werden in Suspension in Serum- und LIF-haltigem Expansionsmedium in bakteriellen Petrischalen bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Alle drei bis vier Tage werden sie mithilfe von Trypsin gesplittet. Dafür wird die Zellsuspension von evtl. andhärierten Zellen durch vorsichtiges Abnehmen des Überstandes getrennt, in ein 15- bzw. 50 ml Falcontube überführt und abzentrifugiert (140 g, 3 min). Der Überstand wird verworfen, das Pellet in PBS resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Nach erneutem Verwerfen des Überstandes wird das Pellet in 0,5-1 ml Trypsin resuspendiert und 1-2 min unter Schütteln bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubationszeit wird das doppelte Volumen an Differenzierungsmedium hinzugegeben und erneut zentrifugiert. Anschließend werden die Zellen in 100-500 µl PBS unter mehrmaligem hoch- und

runterziehen resuspendiert. Je nach Bedarf werden die Zellen danach über ein Zellsieb gegeben (Ausschlussgröße 40  $\mu\text{m}$ ), um nicht vereinzelte Zellsphären auszuschließen. Nach Bestimmung der Zellzahl werden die ES-Zellen mit einer Animpfdichte von  $2 \cdot 10^4$  Zellen / ml (Brachyury) bzw.  $4 \cdot 10^4$  Zellen / ml (iPS YM100) in neue Petrischalen in frisches Expansionsmedium (5-10 ml) überführt. Die Menge des verwendeten Trypsins, Mediums und PBS variieren je nach Menge der behandelten Zellen.

### **Kultivierung in dynamischen Systemen**

Erlenmeyerkolben: 125 ml Kolben werden mit 25 ml Medium befüllt, CultiFlask 50 Tubes werden mit 15 ml Medium befüllt. Spinnerflaschen TCI 1, 2, 3 und der Hersteller Integra Biosciences und Techne Bibby Scientific werden mit jeweils 50 ml befüllt.

Die Schüttel- bzw. Rührgeschwindigkeit wird je nach Versuchsbedingungen variiert.

Die jeweilige Animpfdichte beträgt 2 bzw  $4 \cdot 10^4$  Zellen / ml. Alle Kulturen werden im Inkubator bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

#### **6.6.8.4 Revitalisierung von Zellen**

Die Stammkulturen werden in der Gasphase von flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert. Die Zellen werden zur Revitalisierung aus dem Kryotank entnommen, zügig in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und in 2 ml kaltem Nährmedium aufgenommen. Das im Kryomedium enthaltene DMSO, welches die Kristallbildung während der Kryopräservierung verhindert, wird durch 3 minütige Zentrifugation bei 400 g entfernt. Das Zellpellet wird dann in Nähr- bzw. Expansionsmedium aufgenommen, in Zellkultur- oder Petrischalen überführt und bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

#### **6.6.8.5 Kryopräservierung von Zellen**

##### **PC-12 und NIH-3T3 Zellen:**

Zur Langzeitlagerung werden die Zellen wie oben beschrieben bei Erreichen der Konfluenz durch Trypsinbehandlung vom Flaschenboden abgelöst. Durch 3 minütige Zentrifugation bei 400 g werden die Zellen pelletiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Zur Konservierung werden die Zellen in Kryomedium aufgenommen, so dass eine Zellkonzentration von  $0,4-1,0 \cdot 10^7$  Zellen / ml pro Kryoröhrchen aliquotiert werden kann.

**Brachyury ES-Zellen und iPS-Zellen:**

Zellsphären an Tag 2 bis 3 der undifferenzierten Kultur werden in ein Falcontube überführt und unter stehen lassen absedimentiert (nicht abzentrifugiert). Der Überstand wird verworfen, woraufhin das lockere Zellpellet in Expansionsmedium resuspendiert wird. Unter kräftigem Schütteln wird das gleiche Volumen Kryomedium vorsichtig dazu getropft.

Es werden 1,5 ml Zellsuspension pro Kryoröhrchen bei -80°C in einer Nunc-Gefrierbox eingefroren und nach 2-3 Tagen in den Kryotank überführt.

**6.6.8.6 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität**

Unter Verwendung einer Trypanblau-Lösung sowie der Zählkammer nach Neubauer werden Gesamtzellzahl und Zellvitalität bestimmt. Zur Bestimmung der Zellzahl werden 10 µl Zellsuspension in die Neubauer-Kammer pipettiert und nach Auszählen je eines Großquadrates die Zellzahl pro ml bestimmt, indem die gezählte Zellzahl mit dem Faktor  $10^4$  multipliziert wird. Der Farbstoff Trypanblau ist sehr hydrophil und kann ausschließlich die Plasmamembran toter oder sterbender Zellen passieren. So können die ungefärbten lebenden Zellen von den spezifisch blau gefärbten toten Zellen unterschieden werden. Die Vitalität wird angegeben als Anteil lebender Zellen im Bezug auf die Gesamtzellzahl bestehend aus lebenden ( $X_{leb}$ ) und toten Zellen ( $X_{tot}$ ):

$$\text{Vitalität (\%)} = ((X_{leb}) / (X_{leb} + X_{tot})) \cdot 100$$

**6.6.8.7 Bestimmung der Verdopplungszeit  $t_D$  und der spezifischen Wachstumsrate  $\mu$** 

Unter der Annahme eines exponentiellen Wachstums zwischen den jeweiligen Kulturpassagen wird die spezifische Wachstumsrate  $\mu$  mit der Formel:

$$\mu = \ln(X_{t3}/X_{t0}) / (t_3 - t_0)$$

und die Verdopplungszeit  $t_D$  laut

$$t_D = \ln 2 / \mu$$

berechnet.  $X_{t0}$  gibt dabei die Animpfdichte,  $X_{t3}$  die Zelldichte an Tag 3 (mit  $t_3 = 78$  h) innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase an.



### **6.6.9 MTT Test**

Der MTT-Test ist eine photometrische Methode, mit der die Stoffwechselaktivität von Zellen gemessen werden kann. Die Zellen werden mit MTT versetzt, welches in den Mitochondrien mit NADH zu einem blauen Formazansalz (3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenylformazan) umgesetzt wird und mit dem Plattenleser, nach Auflösen der gebildeten Kristalle mit einer SDS-Lösung, bei 570 nm gemessen werden kann. Eine Referenzmessung erfolgt bei 630 nm, um Nebeneffekte durch Medienbestandteile auszuschließen. Der endgültige Messwert berechnet sich aus der Differenz der beiden Absorptionswerte.

Zur Bestimmung der Viabilität werden  $3 \cdot 10^3$  Zellen pro Kavität einer 96-Lochplatte in 200 µl Medium ausgesät. Je nach Versuchsbedingungen wird an verschiedenen Tagen durch Zugabe von MTT und anschließender SDS-Behandlung der MTT-Test durchgeführt.

### **6.6.10 Differenzierung von ES- und iPS-Zellen über Embryoid Bodies**

#### **6.6.10.1 Differenzierung mittels hängender Tropfen (*hanging drops*)**

Am ersten Tag der Differenzierung (Tag 0) werden die Zellsphären mittels Trypsin vereinzelt und die Zellen gezählt. Anschließend werden die Zellen in einer Konzentration von 30.000 / ml in Differenzierungsmedium resuspendiert. Dann werden Tropfen mit je 600 Zellen in einem Volumen von 20 µl auf die Deckelunterseite einer Petrischale platziert (ca. 50-60 Tropfen). Um ein Austrocknen der Tropfen während der Inkubation bei 37°C im Zellkulturschrank zu verhindern, wird der Boden der Petrischale mit ca. 10 ml PBS befüllt. An Tag 3 (48 h nach der Aussaat in *hanging drops*) werden die einzelnen Tropfen mit den darin enthaltenen *Embryoid Bodies* (EBs) abgenommen und in mit Agarose beschichtete Petrischalen überführt. 10 ml DMEM Medium werden dazu mit 1 % Agarose aufgekocht und über einen Sterilfilter auf dem Boden einer neuen Petrischale verteilt. 10 ml Differenzierungsmedium werden auf die Agarose gegeben, so dass abschließend die EBs aus den *hanging drops* überführt werden können. Die Agarosebeschichtung wird hierbei für ein Unterbinden der EB-Adhärenz durchgeführt. 48 h nach der Überführung der EBs auf Agarose beschichtete Petrischalen erfolgt an Tag 5 die Überführung der EBs in Gelatinebeschichtete 6-Lochplatten (8 bis 12 EBs / Kavität, mindestens vier Kavitäten), in die je 3 ml Differenzierungsmedium vorgelegt werden. Durch Schwenken wird eine gleichmäßige Verteilung der EBs im Differenzierungsmedium erreicht. Hier adhären schließlich die EBs. Alle zwei bis drei Tage erfolgt der Mediumwechsel mit 2,5-3 ml frischem

Differenzierungsmedium.

#### **6.6.10.2 Differenzierung ausgehend von Zellsphären**

Hierfür werden suspendierte Zellsphären (ca. 100-1000) am Ende einer Passage nicht trypsiniert, sondern direkt in Differenzierungsmedium in unbeschichtete Petrischalen überführt (Tag 0). Hier verbleiben sie die folgenden 4 Tage, bis sie ebenfalls in Gelatinebeschichtete 6-Lochplatten überführt werden (8 bis 12 EBs / Kavität, mindestens vier Kavitäten). Durch Schwenken wird eine gleichmäßige Verteilung der EBs im Differenzierungsmedium erreicht. Hier adhärieren schließlich die EBs. Alle zwei bis drei Tage erfolgt der Mediumwechsel mit 2,5-3 ml frischem Differenzierungsmedium.

#### **6.6.10.3 Auswertung der kardialen Differenzierung**

Um den Anteil an *Embryoid Bodies* mit kontrahierenden Zellarealen zu bestimmen, werden diese täglich mikroskopisch ausgezählt (von Tag 10 bis Tag 20 der Differenzierung), wobei EBs mit kontrahierenden Arealen als „positiv“, und EBs ohne kontrahierende Areale als „negativ“ dokumentiert werden. Dabei werden pro Differenzierungsansatz mindest vier Kavitäten einer 6-Lochplatte mit jeweils 8 bis 12 EBs / Kavität ausgezählt. Der Anteil kontrahierender Zellareale wird berechnet als Mittelwert aller ausgezählten Kavitäten.

#### **6.6.11 Durchflusszytometrische Analyse der Expression von Pluripotenzmarkern**

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur gleichzeitigen Messung der Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften von Zellen. Durch die Messung der Streulichteigenschaften lassen sich Rückschlüsse über morphologische Größen wie die Zellgranularität oder die Zellgröße gewinnen. Über die Färbung der Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen können weitere Eigenschaften einzelner Zellen vermessen werden. Diese Methode erlaubt gezielte Einzelzellanalysen großer Zellpopulationen und somit quantitative und statistische Auswertungen der Messsignale. Die erhaltenen Messdaten der einzelnen Zellen werden mit der Software WinMDI 2.8 (Joseph Trotter) ausgewertet.

#### **Durchführung:**

Vor der Färbung werden die zu untersuchenden Zellen gezählt, einmal mit PBS gewaschen und auf eine Konzentration von  $1 \cdot 10^6$  Zellen / ml in Blockpuffer resuspendiert. Dann werden

die Antikörperlösungen (AK) hergestellt (Antikörperlösung mit entsprechender Menge Block- bzw. Saponinlösung verdünnt) für den Nachweis von:

SSEA-1:

FITC-Mouse anti-SSEA-1		Isotypkontrollantikörper	
Blockpuffer [μL]	AK [μL]	Blockpuffer [μL]	AK* [μL]
10	10	13,7	6,3

\*Stammlösung 1:50 verdünnen mit Blockpuffer

PE-Mouse anti-SSEA-1		Isotypkontrollantikörper	
Blockpuffer [μL]	AK [μL]	Blockpuffer [μL]	AK [μL]
10	10	17	3

E-Cadherin:

FITC-Mouse anti-E-cadherin		Isotypkontrollantikörper	
Blockpuffer [μL]	AK [μL]	Blockpuffer [μL]	AK [μL]
19	1	13,7	6,3

Oct-3/4:

PE-Mouse anti-Oct-3/4		Isotypkontrollantikörper	
Saponinlösung [μL]	AK [μL]	Saponinlösung [μL]	AK [μL]
16	4	19	1

### **Färbeprotokoll für den Nachweis der Oberflächenmarker SSEA-1 und E-Cadherin**

- 100 μL ( $10^5$  Zellen) in Probenröhrchen überführen
- 20 μL Antikörperlösung zugeben und vorsichtig mischen
- 20 min im Dunkeln bei RT inkubieren
- 400 μL Blockpuffer zusetzen
- 1 μl Propidiumiodidlösung hinzugeben
- sofort im DFZ analysieren.

**Färbeprotokoll für intrazellulären Oct-3/4 Nachweis**

- 300-500  $\mu\text{L}$  ( $3\text{-}5\cdot 10^5$  Zellen) in 1,5 ml Tube überführen
- zentrifugieren (3 min, 200 g)
- Zellpellet in 500  $\mu\text{L}$  Fixierungslösung resuspendieren und 20 min bei 4°C inkubieren
- zwei mal mit Saponinlösung waschen
- in 300-500  $\mu\text{L}$  Saponinlösung resuspendieren
- pro Test 100  $\mu\text{L}$  ( $10^5$  Zellen) in Proberöhrchen überführen
- 20  $\mu\text{L}$  der Antikörperlösung zugeben und 30 min bei 4° inkubieren
- zwei mal mit Saponinlösung waschen
- Zellpellet in 500  $\mu\text{L}$  Saponinlösung resuspendieren und im DFZ analysieren.

**6.6.12 *Annexin-V Assay zur Apoptosemessung mittels Durchflusszytometrie***

Zur Identifizierung und Unterscheidung von lebenden, toten (nekrotischen) und frühapoptotischen Zellen kann die Annexin-V-FITC-Methode angewendet werden. Sie beruht auf der Bindung des FITC-gekoppelten Annexin-V an Phosphatidylserin in Kombination mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid.

Während der Apoptose wird Phosphatidylserin (PS), das auf der Innenseite der Zellmembran einer lebenden Zelle zu finden ist, auf die Außenseite der Membran lokalisiert. Annexin-V bindet spezifisch an PS und kann dadurch apoptotische Zellen nachweisen. Durch den Zusatz von Propidiumiodid (PI) lassen sich darüber hinaus tote (nekrotische) Zellen detektieren. PI ist ein Farbstoff, der in die DNA von Zellen interkaliert. Dabei kann PI allerdings lediglich die DNA nekrotischer oder spät apoptotischer Zellen färben, deren Zellwände nicht mehr intakt sind. Durch die Kombination der Fluoreszenzsignale von PI und Annexin lassen sich somit spezifisch nekrotische von früh apoptotischen und vitalen Zellen unterscheiden. Lebende Zellen sind bei der Analyse folglich Annexin- und PI-negativ, apoptotische Zellen zeigen ein positives Signal für Annexin-V und sind PI-negativ, nekrotische Zellen hingegen sind Annexin- und PI-positiv.

Als Positiv-Kontrolle für die Apoptose werden Zellen für 90 min mit 25 mM *trans*- $\beta$ -Nitrostyrol<sup>125</sup> inkubiert. Der Annexin-V Assay wird mithilfe des FITC Annexin V Apoptosis Detection Kits I (BD Biosciences) wie folgt durchgeführt:

- 300-500  $\mu\text{L}$  ( $3\text{-}5\cdot 10^5$  Zellen) in 1,5 ml Tube überführen
- zentrifugieren (3 min, 200 g)
- Zellpellet in 300-500  $\mu\text{L}$  1 x Annexin V- Bindungspuffer\* resuspendieren

- 100 µl ( $1 \cdot 10^5$  Zellen) in Proberöhrchen überführen
- je 2,5 µl FITC Annexin V- und Propidiumiodidlösung hinzugeben, 15 min bei Raumtemperatur inkubieren
- 400 µL 1 x Annexin V- Bindungspuffer zusetzen
- sofort im DFZ analysieren.

\* enthalten im Detection Kit

### **6.6.13 RNA-Isolierung und RT-PCR**

Im Lauf der Differenzierung von Brachyury ES-Zellen werden an Tagen 0, 4, 8, 16 und 22 RNA-Proben für eine anschließende RT-PCR Analyse isoliert.

Nach der Entfernung des Mediums werden auf die Zellen je 0,5 ml RLT-Puffer (Lysispuffer, Qiagen) mit 1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1 min wird der Puffer kurz auf- und abpipettiert. Anschließend wird die Suspension ca. 10 min auf Eis unter mehrmaligem Schwenken inkubiert, wodurch die Zellen lysiert werden. Die RNA wird daraufhin mit dem „RNeasy Plus Mini Kit“ nach Herstellerangaben (Qiagen) isoliert. Die Reinheit und Konzentration der RNA wird anschließend mithilfe des NanoDrops 1000 bestimmt.

Die aufgereinigte Gesamt-RNA setzt sich aus tRNA, rRNA und mRNA zusammen, wobei die mRNA nur ca. 3 % dieser RNA-Population darstellt. Da die Erfassung einer bestimmten mRNA wegen der sehr geringen Ausgangskonzentration in der Zelle nur schwierig zu erreichen ist, wird eine Amplifikation selbiger mittels der Polymerasekettenreaktion durchgeführt. Hierzu wird die gesamte mRNA zunächst mithilfe eines oligo-dT-Primers (5' d(T)18 3', Fermentas, St. Leon-Rot) Fermentas, in cDNA umgeschrieben. Die so genannte Erststrangsynthese wird wie folgt durchgeführt:

Reaktionsansatz:

2 µg	RNA
3 µl	oligo-dT-Primer (100 µM)
ad 21 µl	RNAse freies H <sub>2</sub> O; pH 8,4

Um Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen, wird das Gemisch zunächst 5 min. bei 65°C inkubiert. Nach 1 minütiger Abkühlung auf Eis werden folgende restliche Komponenten dazugegeben:

8 µl	5x M-MLV-Puffer
4 µl	dNTP's (2 mM)
6 µl	RNAse freies H <sub>2</sub> O; pH 8,4
1 µl	M-MLV Reverse Transkriptase (200 u/µl)

Die cDNA-Synthese dauert unter optimalen Bedingungen für die M-MLV-Reverse Transkriptase (37°C, pH 8,3-8,4) 60 Minuten.

Danach werden die Ziel-Sequenzen separat mittels genspezifischer und intronüberspannender *Primer* in einer PCR amplifiziert.

### PCR-Ansatz:

- 18,88 µl H<sub>2</sub>O
- 2,5 µl Puffer C
- 2 µl dNTP's
- 1 µl *Primer* (s. Tabelle 4)
- 0,5 µl cDNA und
- 0,125 µl DNA-Polymerase

Zu Beginn der PCR erfolgt eine Denaturierung für 5 min bei 95 °C. Anschließend wird die Amplifizierung in 30-35 Zyklen und mit folgenden Zeiten und Temperaturen durchgeführt:

Denaturierung	30 s	95 °C
<i>Primer-Annealing</i>	30 s	Temperaturen s. Tabelle 4
Strang-Verlängerung	30 s	72 °C

Zur Überprüfung der entstandenen PCR-Produkte werden diese 1:1 mit 2-fach Ladepuffer vermischt, auf ein 2 % iges Agarosegel aufgetragen und bei 100 V für eine Dauer von 50 min. elektrophoretisch aufgetrennt (Laufpuffer TAE). Im Ladepuffer enthaltenes Ethidiumbromid färbt die DNA und erlaubt eine UV-Detektion der PCR-Produkte.

**Tabelle 4** Sequenzen, Annealing-Temperaturen, Bindungsregionen und Accession-Nummern der verwendeten *Primer*. Alle *Primer* wurden von MWG Biotech, Ebersberg, bezogen.

Gen	Sequenz Forward-Primer	Sequenz Reverse-Primer	Annealing-Temperatur (°C)	Länge des PCR-Produkts (nt)/Region	Accession-Number (NCBI)
Oct-3/4	ATCACTCACAT CGCCAATCA	CTGGGAAAGG TGTCCTGTGA	53,4	142/818-959	NM_013633
Nanog	ATGCCTGCAGT TTTTCATCC	ACAGTCCGCAT CTTCTGCTT	53,4	229/76-304	NC_000072.5
Rex-1	TCCCCAAATAC CACTGACCAAA AA	GGGCGGCCTGC AAGTAATGAG C	58,2	559	NT_039460.7
Nestin	GATCGCTCAGA TCCTGGAAG	ATTAGGCAAG GGGGAAGAGA	59,1	256/944-1199	NM_016701
FoxA2	GACTGGAGCA GCTACTACGCG	GCTCAGACTCG GACTCAGGT	56,5	294/151-444	GI:6753897
AFP	TGAACTCTGGT ATCAGCCACTG	AGTTCAGGCTT TTGCTTCACC	56,4	211/1511-1721	GI:31982512
Brachyury	CTCCAACCTAT GCGGACAAT	CCCCTTCATAC ATCGGAGAA	56,4	318/1007-1324	NM_009309
Mesp1	CGTTCCAGTAC GCAGAAACA	CAATCATCCGT TGCATTGTC	57,2	165/684-848	NM_008588
$\alpha$ -MHC	CAGAGGAGAA GGCTGGTGTC	CTGCCCCTTGG TGACATACT	57,3	218/1133-1350	NM_010856
ANF	GGGGGTAGGA TTGACAGGAT	CAGAGTGGGA GAGGCAAGAC	57,3	273/480-752	NM_008725
GAPDH	AACTTTGGCAT TGTGGAAGG	ACACATTGGGG GTAGGAACA	53,2	223/554-776	BC020407

#### 6.6.14 *Fixierung und DAPI Färbung von Zellen*

DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) ist ein Farbstoff, der an DNA bindet und spezifisch die Zellkerne nachweist. Hierzu werden die Zellen zunächst mit GFP-Flow Fix Puffer fixiert (10 min bei 4°C) und anschließend zwei mal mit 1 x PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit DAPI-Lösung (1 µg / ml) 15 min. bei 37°C in Dunkelheit inkubiert. Nach abschließendem dreimaligen Waschen mit 1 x PBS werden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

## 6.7 Ergänzende Ergebnisse

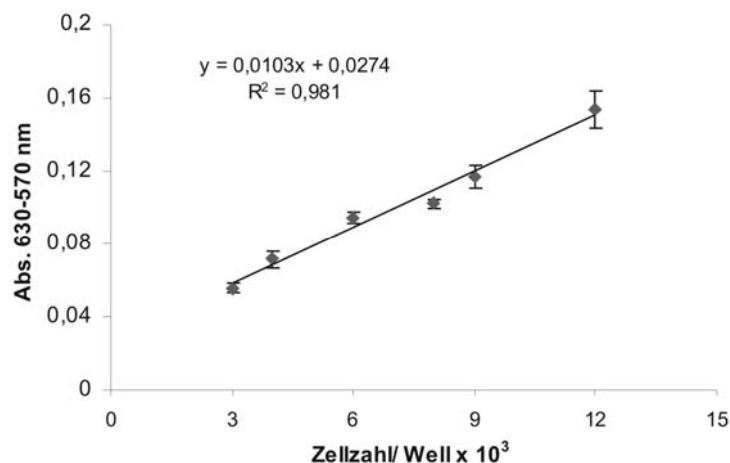
### 6.7.1 *Bestimmung der Korrelation von Viabilität zu Zellzahl anhand von NIH-3T3 Kulturen*

Um Viabilität und Proliferation von Zellen mittels MTT-Test miteinander korrelieren zu können wurde folgender Vorversuch durchgeführt:

In einer 96-Lochplatte wurden Zellsuspensionen mit sechs verschiedenen Konzentrationen ausplattiert (3, 4, 6, 8, 9 und  $12 \cdot 10^3$  Zellen/ Kavität,  $n=4$ ). Drei Tage später wurde durch Zugabe von MTT die Farbreaktion gestartet und nach Zugabe von SDS die Lösung photometrisch vermessen.

In Abbildung 6.2 ist die Korrelation von Zellzahl zu Absorptionssignal zu erkennen. Je größer die anfangs ausplattierte Zelldichte, desto größer war das Absorptionssignal in diesen Kavitäten. Das Signal war hierbei direkt proportional zur ausplattierten Zelldichte und somit zur aktuellen Zellzahl.

**Fazit:** Beim MTT-Test mit NIH-3T3 Zellen kann die Viabilität in Korrelation zur Zellzahl gesetzt werden.



**Abbildung 6.2** Abhängigkeit des Absorptionssignals (bzw. der Differenz der Signale bei 630 und 570 nm) von der ausplattierten Zelldichte.

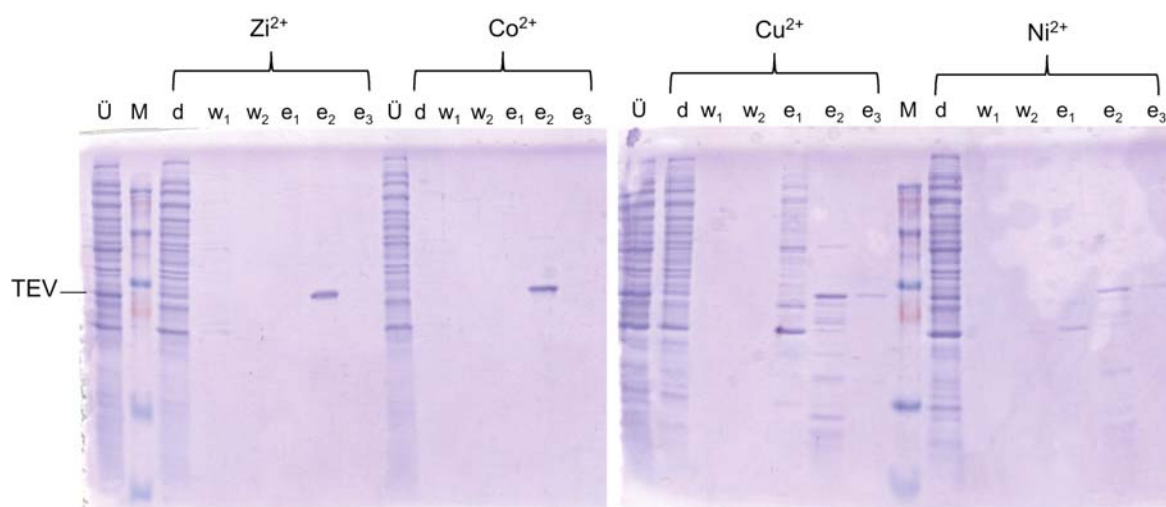


### 6.7.2 *Ermittlung eines geeigneten Metallkations zur Aufreinigung der TEV-Protease*

Die Bindung an die mit Metallionen funktionalisierte stationäre Phase kann von der Tertiärstruktur des aufzureinigenden Proteins und der Position des His-tags innerhalb der Aminosäurenkette stark abhängen. Die Verwendung eines geeigneten Metallkations spielt für den Erfolg der Aufreinigung ebenfalls eine Rolle.

Mithilfe von Vivawell 8-Strips wurden vier verschiedene Metallionen getestet. Das detaillierte Protokoll dieser Test-Aufreinigungen befindet sich in Abschnitt 6.6.2 und wurde in Anlehnung an eine etablierte Methode von Öznur Kökpınar durchgeführt, bei dem gebundenes Protein mit 250 mM Imidazol eluiert wird.

In Abbildung 6.3 sind die Ergebnisse der verschiedenen Aufreinigungen zu sehen. Die TEV-Protease wird mithilfe von  $\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{Co}^{2+}$  als reines Protein eluiert, während die Elutionsfraktionen von den mit  $\text{Ni}^{2+}$  und  $\text{Cu}^{2+}$  beladenen Membranen viele Verunreinigungen aufweisen. Aus praktischen Gründen wird zur präparativen Aufreinigung der TEV-Protease (wie des hLIF-Fusionsproteins)  $\text{Zn}^{2+}$  als Metallkation verwendet.



**Abbildung 6.3** Ergebnis der SDS PAGE der Aufreinigung der TEV-Protease über Vivawell 8-Strips (IDA, 5 Layer). Abgebildet sind die jeweiligen Fraktionen nach der Probenbeladung (d, Durchbruch), der Waschschritte ( $w_1$ ,  $w_2$ ) und der Elutionen  $e_1$  bis  $e_3$  mit 100 bzw. 250 mM Imidazol. Abkürzungen: Ü: nicht aufgereinigtes Zelllysate, (Überstand).  $\text{Ni}^{2+}$ : Nickel,  $\text{Co}^{2+}$ : Cobalt,  $\text{Cu}^{2+}$ : Kupfer,  $\text{Zn}^{2+}$ : Zink M: Molekulargewichtsmarker (Fermentas SM1811), TEV: Tobacco Etch Virus Protease.

## 7 Referenzen

1. Friedenstein A J, Chailakhjan R K, Lalykina K S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 1970, 3, (4), 393-403.
2. Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini M M, Davies J E. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells.* 2005, 23, (2), 220-9.
3. Rose R A, Keating A, Backx P H. Do mesenchymal stromal cells transdifferentiate into functional cardiomyocytes? *Circ Res.* 2008, 103, (9), e120.
4. Rose R A, Jiang H, Wang X, Helke S, Tsoporis J N, Gong N, Keating S C, Parker T G, Backx P H, Keating A. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells express cardiac-specific markers, retain the stromal phenotype, and do not become functional cardiomyocytes in vitro. *Stem Cells.* 2008, 26, (11), 2884-92.
5. Serafini M, Verfaillie C M. Pluripotency in adult stem cells: state of the art. *Semin Reprod Med.* 2006, 24, (5), 379-88.
6. Verfaillie C M. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol.* 2002, 12, (11), 502-8.
7. Gorba T, Allsopp T E. Pharmacological potential of embryonic stem cells. *Pharmacological Research.* 2003, 47, (4), 269-278.
8. Rubin L L. Stem cells and drug discovery: the beginning of a new era? *Cell.* 2008, 132, (4), 549-52.
9. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007, 131, (5), 861-72.
10. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006, 126, (4), 663-76.
11. Kim D, Kim C H, Moon J I, Chung Y G, Chang M Y, Han B S, Ko S, Yang E, Cha K Y, Lanza R, Kim K S. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell.* 2009, 4, (6), 472-6.
12. Li W, Zhou H, Abujarour R, Zhu S, Young Joo J, Lin T, Hao E, Scholer H R, Hayek A, Ding S. Generation of human-induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2. *Stem Cells.* 2009, 27, (12), 2992-3000.
13. Zweigerdt R. Large Scale Production of Stem Cells and Their Derivatives. *Engineering of Stem Cells.* 2009, 114, 201-235.
14. Docherty K, Bernardo A S, Vallier L. Embryonic stem cell therapy for diabetes mellitus.

Semin Cell Dev Biol. 2007, 18, (6), 827-38.

15. Schroeder M, Niebruegge S, Werner A, Willbold E, Burg M, Ruediger M, Field L J, Lehmann J, Zweigerdt R. Differentiation and lineage selection of mouse embryonic stem cells in a stirred bench scale bioreactor with automated process control. *Biotechnol Bioeng*. 2005, 92, (7), 920-33.

16. Niebruegge S, Nehring A, Bar H, Schroeder M, Zweigerdt R, Lehmann J. Cardiomyocyte production in mass suspension culture: embryonic stem cells as a source for great amounts of functional cardiomyocytes. *Tissue Eng Part A*. 2008, 14, (10), 1591-601.

17. Adjaye J A, Byskov A G, Cibelli J B, De Maria R, Minger S, Sampaolesi M, Testa G, Verfaillie C, Zernicka-Goetz M, Scholer H, Boiani M, Crosetto N, Redi C A. Pluripotency and differentiation in embryos and stem cells. *Int J Dev Biol*. 2008, 52, (7), 801-9.

18. Stemple D L, Anderson D J. Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. *Cell*. 1992, 71, (6), 973-85.

19. Rietze R L, Valcanis H, Brooker G F, Thomas T, Voss A K, Bartlett P F. Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain. *Nature*. 2001, 412, (6848), 736-9.

20. Seaberg R M, Smukler S R, Kieffer T J, Enikolopov G, Asghar Z, Wheeler M B, Korbitt G, van der Kooy D. Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages. *Nat Biotechnol*. 2004, 22, (9), 1115-24.

21. Kogler G, Sensken S, Airey J A, Trapp T, Muschen M, Feldhahn N, Liedtke S, Sorg R V, Fischer J, Rosenbaum C, Greschat S, Knipper A, Bender J, Degistirici O, Gao J, Caplan A I, Colletti E J, Almeida-Porada G, Muller H W, Zanjani E, Wernet P. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med*. 2004, 200, (2), 123-35.

22. Wagner W, Ho A D. Mesenchymal stem cell preparations--comparing apples and oranges. *Stem Cell Rev*. 2007, 3, (4), 239-48.

23. Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981, 292, (5819), 154-6.

24. Martin G R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981, 78, (12), 7634-8.

25. Thomson J, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S, Waknitz M, Swiergiel J, Marshall V, Jones J. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *SCIENCE*. 1998, 282, (5391), 1145-1147.

26. Keller G M. In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol*. 1995, 7, (6), 862-9.

27. <http://www.stem-cell-treatment-now.com/Stem-cell-education.html>

28. <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/appendix>.
29. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*. 2003, 113, (5), 643-55.
30. Ben-Shushan E, Thompson J R, Gudas L J, Bergman Y. Rex-1, a gene encoding a transcription factor expressed in the early embryo, is regulated via Oct-3/4 and Oct-6 binding to an octamer site and a novel protein, Rox-1, binding to an adjacent site. *Mol Cell Biol*. 1998, 18, (4), 1866-78.
31. Shi W, Wang H, Pan G, Geng Y, Guo Y, Pei D. Regulation of the pluripotency marker Rex-1 by Nanog and Sox2. *J Biol Chem*. 2006, 281, (33), 23319-25.
32. Berstine E G, Hooper M L, Grandchamp S, Ephrussi B. Alkaline phosphatase activity in mouse teratoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973, 70, (12), 3899-903.
33. Blyszczuk P, Wobus A M. In vitro differentiation of embryonic stem cells into the pancreatic lineage. *Methods Mol Biol*. 2006, 330, 373-85.
34. Lim J W, Bodnar A. Proteome analysis of conditioned medium from mouse embryonic fibroblast feeder layers which support the growth of human embryonic stem cells. *Proteomics*. 2002, 2, (9), 1187-203.
35. Amit M, Margulets V, Segev H, Shariki K, Laevsky I, Coleman R, Itskovitz-Eldor J. Human feeder layers for human embryonic stem cells. *Biol Reprod*. 2003, 68, (6), 2150-6.
36. Vemuri M C, Schimmel T, Colls P, Munne S, Cohen J. Derivation of human embryonic stem cells in xeno-free conditions. *Methods Mol Biol*. 2007, 407, 1-10.
37. [http://www.rndsystems.com/stem\\_cell\\_protocol\\_detail\\_objectname\\_iMEF.aspx](http://www.rndsystems.com/stem_cell_protocol_detail_objectname_iMEF.aspx) Culturing BG01V Human Embryonic Stem Cells on Irradiated Mouse Embryonic Fibroblasts (iMEF).
38. Richards S, Leavesley D, Topping G, Upton Z. Development of defined media for the serum-free expansion of primary keratinocytes and human embryonic stem cells. *Tissue Eng Part C Methods*. 2008, 14, (3), 221-32.
39. Hoffman L M, Carpenter M K. Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2005, 23, (6), 699-708.
40. Smith A G, Heath J K, Donaldson D D, Wong G G, Moreau J, Stahl M, Rogers D. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*. 1988, 336, (6200), 688-90.
41. Nichols J, Evans E P, Smith A G. Establishment of germ-line-competent embryonic stem (ES) cells using differentiation inhibiting activity. *Development*. 1990, 110, (4), 1341-8.
42. Ying Q L, Nichols J, Chambers I, Smith A. BMP induction of Id proteins suppresses

differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell*. 2003, 115, (3), 281-92.

43. Xu C, Inokuma M S, Denham J, Golds K, Kundu P, Gold J D, Carpenter M K. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2001, 19, (10), 971-4.

44. Daheron L, Opitz S L, Zaehres H, Lensch M W, Andrews P W, Itskovitz-Eldor J, Daley G Q. LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2004, 22, (5), 770-8.

45. Amit M, Shariki C, Margulets V, Itskovitz-Eldor J. Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Biol Reprod*. 2004, 70, (3), 837-45.

46. Amit M. Feeder-layer free culture system for human embryonic stem cells. *Methods Mol Biol*. 2007, 407, 11-20.

47. Ellerström C, Hyllner J, Strehl R, Single Cell Enzymatic Dissociation of Human Embryonic Stem Cells: A Straightforward, Robust, and Standardized Culture Method. In *Protocols*, S., Ed. 2009; Vol. 584, pp 121-134.

48. <http://www.nuncbrand.com/us/page.aspx?ID=227>. Nunc Produkt Website.

49. Zandstra P W, Bauwens C, Yin T, Liu Q, Schiller H, Zweigerdt R, Pasumarthi K B, Field L J. Scalable production of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Tissue Eng*. 2003, 9, (4), 767-78.

50. Fok E Y, Zandstra P W. Shear-controlled single-step mouse embryonic stem cell expansion and embryoid body-based differentiation. *Stem Cells*. 2005, 23, (9), 1333-1342.

51. Abranches E, Bekman E, Henrique D, Cabral J M. Expansion of mouse embryonic stem cells on microcarriers. *Biotechnol Bioeng*. 2007, 96, (6), 1211-21.

52. Fernandes A M, Fernandes T G, Diogo M M, da Silva C L, Henrique D, Cabral J M. Mouse embryonic stem cell expansion in a microcarrier-based stirred culture system. *J Biotechnol*. 2007, 132, (2), 227-36.

53. Bauwens C, Yin T, Dang S, Peerani R, Zandstra P W. Development of a perfusion fed bioreactor for embryonic stem cell-derived cardiomyocyte generation: oxygen-mediated enhancement of cardiomyocyte output. *Biotechnol Bioeng*. 2005, 90, (4), 452-61.

54. Hwang Y S, Cho J, Tay F, Heng J Y Y, Ho R, Kazarian S G, Williams D R, Boccaccini A R, Polak J M, Mantalaris A. The use of murine embryonic stem cells, alginate encapsulation, and rotary microgravity bioreactor in bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2009, 30, (4), 499-507.

55. Liu H, Roy K. Biomimetic three-dimensional cultures significantly increase hematopoietic differentiation efficacy of embryonic stem cells. *Tissue Eng*. 2005, 11, (1-2), 319-30.

56. Cormier J T, zur Nieden N I, Rancourt D E, Kallos M S. Expansion of undifferentiated murine embryonic stem cells as aggregates in suspension culture bioreactors. *Tissue Eng*. 2006, 12, (11), 3233-3245.

57. zur Nieden N I, Cormier J T, Rancourt D E, Kallos M S. Embryonic stem cells remain highly pluripotent following long term expansion as aggregates in suspension bioreactors. *J Biotechnol.* 2007, 129, (3), 421-432.
58. Amit M, Itskovitz-Eldor J. Patent: Methods of expanding embryonic stem cells in a suspension culture 2008, WO/2008/015682, (PCT/IL2007/000970).
59. Krawetz R, Taiani J T, Liu S, Meng G, Li X, Kallos M S, Rancourt D. Large-Scale Expansion of Pluripotent Human Embryonic Stem Cells in Stirred Suspension Bioreactors. *Tissue Eng Part C Methods.* 2009.
60. Li X, Meng G, Krawetz R, Liu S, Rancourt D E. The ROCK inhibitor Y-27632 enhances the survival rate of human embryonic stem cells following cryopreservation. *Stem Cells Dev.* 2008, 17, (6), 1079-85.
61. Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, Nishiyama A, Matsumura M, Wataya T, Takahashi J B, Nishikawa S, Muguruma K, Sasai Y. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2007, 25, (6), 681-6.
62. Gerecht-Nir S, Cohen S, Itskovitz-Eldor J. Bioreactor cultivation enhances the efficiency of human embryoid body (hEB) formation and differentiation. *Biotechnol Bioeng.* 2004, 86, (5), 493-502.
63. Come J, Nissan X, Aubry L, Tournois J, Girard M, Perrier A L, Peschanski M, Cailleret M. Improvement of culture conditions of human embryoid bodies using a controlled perfused and dialyzed bioreactor system. *Tissue Eng Part C Methods.* 2008, 14, (4), 289-98.
64. Niebruegge S, Bauwens C L, Peerani R, Thavandiran N, Masse S, Sevaptisidis E, Nanthakumar K, Woodhouse K, Husain M, Kumacheva E, Zandstra P W. Generation of human embryonic stem cell-derived mesoderm and cardiac cells using size-specified aggregates in an oxygen-controlled bioreactor. *Biotechnol Bioeng.* 2009, 102, (2), 493-507.
65. Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, Eden A, Yanuka O, Amit M, Soreq H, Benvenisty N. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol Med.* 2000, 6, (2), 88-95.
66. Dang S M, Gerecht-Nir S, Chen J, Itskovitz-Eldor J, Zandstra P W. Controlled, scalable embryonic stem cell differentiation culture. *Stem Cells.* 2004, 22, (3), 275-82.
67. Duplomb L, Dagouassat M, Jourdon P, Heymann D. Differentiation of osteoblasts from mouse embryonic stem cells without generation of embryoid body. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2007, 43, (1), 21-4.
68. Karp J M, Ferreira L S, Khademhosseini A, Kwon A H, Yeh J, Langer R S. Cultivation of human embryonic stem cells without the embryoid body step enhances osteogenesis in vitro. *Stem Cells.* 2006, 24, (4), 835-43.
69. Blyszczuk P, Czyz J, Kania G, Wagner M, Roll U, St-Onge L, Wobus A M. Expression of

- Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003, 100, (3), 998-1003.
70. Sachinidis A, Kolossov E, Fleischmann B K, Hescheler J. Generation of cardiomyocytes from embryonic stem cells experimental studies. *Herz*. 2002, 27, (7), 589-97.
71. Passier R, Mummery C. Cardiomyocyte differentiation from embryonic and adult stem cells. *Curr Opin Biotechnol*. 2005, 16, (5), 498-502.
72. Passier R, Oostwaard D W, Snapper J, Kloots J, Hassink R J, Kuijk E, Roelen B, de la Riviere A B, Mummery C. Increased cardiomyocyte differentiation from human embryonic stem cells in serum-free cultures. *Stem Cells*. 2005, 23, (6), 772-80.
73. Lee A S, Tang C, Cao F, Xie X, van der Bogt K, Hwang A, Connolly A J, Robbins R C, Wu J C. Effects of cell number on teratoma formation by human embryonic stem cells. *Cell Cycle*. 2009, 8, (16), 2608-12.
74. Prokhorova T A, Harkness L M, Frandsen U, Ditzel N, Burns J S, Schroeder H D, Kassem M. Teratoma Formation by Human Embryonic Stem Cells is site-dependent and enhanced by the presence of Matrigel. *Stem Cells Dev*. 2008.
75. Hentze H, Soong P L, Wang S T, Phillips B W, Putti T C, Dunn N R. Teratoma formation by human embryonic stem cells: Evaluation of essential parameters for future safety studies. *Stem Cell Res*. 2009.
76. Sun N, Panetta N J, Gupta D M, Wilson K D, Lee A, Jia F, Hu S, Cherry A M, Robbins R C, Longaker M T, Wu J C. Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009, 106, (37), 15720-5.
77. Giorgetti A, Montserrat N, Aasen T, Gonzalez F, Rodriguez-Piza I, Vassena R, Raya A, Boue S, Barrero M J, Corbella B A, Torrabadella M, Veiga A, Izpisua Belmonte J C. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using OCT4 and SOX2. *Cell Stem Cell*. 2009, 5, (4), 353-7.
78. Haase A, Olmer R, Schwanke K, Wunderlich S, Merkert S, Hess C, Zweigerdt R, Gruh I, Meyer J, Wagner S, Maier L S, Han D W, Glage S, Miller K, Fischer P, Scholer H R, Martin U. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood. *Cell Stem Cell*. 2009, 5, (4), 434-41.
79. Park I H, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A, Lensch M W, Cowan C, Hochedlinger K, Daley G Q. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*. 2008, 134, (5), 877-86.
80. Cytokine Bulletin Differentiation Potential of Induced Pluripotent Stem Cells. [http://www.rndsystems.com/cb\\_detail\\_objectname\\_cb09i2\\_induced\\_pluripotent\\_stem\\_cells.aspx](http://www.rndsystems.com/cb_detail_objectname_cb09i2_induced_pluripotent_stem_cells.aspx).
81. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2007, 448, (7151), 313-7.

82. Yu J, Vodyanik M A, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane J L, Tian S, Nie J, Jonsdottir G A, Ruotti V, Stewart R, Slukvin, II, Thomson J A. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007, 318, (5858), 1917-20.
83. Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*. 2008, 322, (5903), 949-53.
84. Ebert A D, Yu J, Rose F F, Jr., Mattis V B, Lorson C L, Thomson J A, Svendsen C N. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*. 2009, 457, (7227), 277-80.
85. Mali P, Ye Z, Hommond H H, Yu X, Lin J, Chen G, Zou J, Cheng L. Improved efficiency and pace of generating induced pluripotent stem cells from human adult and fetal fibroblasts. *Stem Cells*. 2008, 26, (8), 1998-2005.
86. Zhou H, Wu S, Joo J Y, Zhu S, Han D W, Lin T, Trauger S, Bien G, Yao S, Zhu Y, Siuzdak G, Scholer H R, Duan L, Ding S. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell*. 2009, 4, (5), 381-4.
87. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol*. 2008, 26, (1), 101-6.
88. Ran C. Laufende Dissertation. Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover.
89. Prilop W. Herstellung von Wachstumsfaktoren für das Tissue Engineering am Beispiel des basischen Fibroblastenwachstumsfaktors FGF-2. Diplomarbeit. Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, 2008.
90. Zhao Y. Optimization of basic fibroblast growth factor recovery from recombinant E.coli production. Diplomarbeit. Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover.
91. Gearing D P, Gough N M, King J A, Hilton D J, Nicola N A, Simpson R J, Nice E C, Kelso A, Metcalf D. Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF). *Embo J*. 1987, 6, (13), 3995-4002.
92. Hilton D J. LIF: lots of interesting functions. *Trends Biochem Sci*. 1992, 17, (2), 72-6.
93. Kristensen D M, Kalisz M, Nielsen J H. Cytokine signalling in embryonic stem cells. *APMIS*. 2005, 113, (11-12), 756-72.
94. Niwa H, Miyazaki J, Smith A G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*. 2000, 24, (4), 372-6.
95. Middelberg A P. Preparative protein refolding. *Trends Biotechnol*. 2002, 20, (10), 437-43.
96. Hoffmann F, van den Heuvel J, Zidek N, Rinas U. Minimizing inclusion body formation during recombinant protein production in *Escherichia coli* at bench and pilot plant scale. *Enzyme and Microbial Technology*. 2004, 34, (3-4), 235-241.



97. Weickert M J, Doherty D H, Best E A, Olins P O. Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol*. 1996, 7, (5), 494-9.
98. Mogk A, Mayer M P, Deuerling E. Mechanisms of protein folding: molecular chaperones and their application in biotechnology. *Chembiochem*. 2002, 3, (9), 807-14.
99. Sorensen H P, Mortensen K K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*. 2005, 4, (1), 1.
100. Davis G D, Elisee C, Newham D M, Harrison R G. New fusion protein systems designed to give soluble expression in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*. 1999, 65, (4), 382-8.
101. Kapust R B, Waugh D S. *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci*. 1999, 8, (8), 1668-74.
102. Hammarstrom M, Hellgren N, van Den Berg S, Berglund H, Hard T. Rapid screening for improved solubility of small human proteins produced as fusion proteins in *Escherichia coli*. *Protein Sci*. 2002, 11, (2), 313-21.
103. LaVallie E R, DiBlasio E A, Kovacic S, Grant K L, Schendel P F, McCoy J M. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Bio/Technology* 1993, 11, (2), 187-93.
104. Yasukawa T, Kanei-Ishii C, Maekawa T, Fujimoto J, Yamamoto T, Ishii S. Increase of solubility of foreign proteins in *Escherichia coli* by coproduction of the bacterial thioredoxin. *J Biol Chem*. 1995, 270, (43), 25328-31.
105. Stewart E, Aslund F, Beckwith J. Disulfide bond formation in the *Escherichia coli* cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins. *Embo J*. 1998, 17, (19), 5543-50.
106. Xu C, Rosler E, Jiang J, Lebkowski J S, Gold J D, O'Sullivan C, Delavan-Boorsma K, Mok M, Bronstein A, Carpenter M K. Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium. *Stem Cells*. 2005, 23, (3), 315-23.
107. Knoerzer W, Binder H P, Schneider K, Gruss P, McCarthy J E, Risau W. Expression of synthetic genes encoding bovine and human basic fibroblast growth factors (bFGFs) in *Escherichia coli*. *Gene*. 1989, 75, (1), 21-30.
108. Anspach F B, Spille H, Rinas U. Purification of recombinant human basic fibroblast growth factor: stability of selective sorbents under cleaning in place conditions. *J Chromatogr A*. 1995, 711, (1), 129-39.
109. Isacchi A, Statuto M, Chiesa R, Bergonzoni L, Rusnati M, Sarmientos P, Ragnotti G, Presta M. A six-amino acid deletion in basic fibroblast growth factor dissociates its mitogenic activity from its plasminogen activator-inducing capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991, 88, (7), 2628-32.
110. Buntrock P, Buntrock M, Marx I, Kranz D, Jentzsch K D, Heder G. Stimulation of

wound healing, using brain extract with fibroblast growth factor (FGF) activity. III. Electron microscopy, autoradiography, and ultrastructural autoradiography of granulation tissue. *Exp Pathol.* 1984, 26, (4), 247-54.

111. Gospodarowicz D, Bialecki H, Thakral T K. The angiogenic activity of the fibroblast and epidermal growth factor. *Exp Eye Res.* 1979, 28, (5), 501-14.

112. Walicke P, Cowan W M, Ueno N, Baird A, Guillemin R. Fibroblast growth factor promotes survival of dissociated hippocampal neurons and enhances neurite extension. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986, 83, (9), 3012-6.

113. Greene L A, Tischler A S. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1976, 73, (7), 2424-8.

114. Wu Y Y, Bradshaw R A. Effect of nerve growth factor and fibroblast growth factor on PC12 cells: inhibition by orthovanadate. *J Cell Biol.* 1993, 121, (2), 409-22.

115. Neufeld G, Gospodarowicz D, Dodge L, Fujii D K. Heparin modulation of the neurotropic effects of acidic and basic fibroblast growth factors and nerve growth factor on PC12 cells. *J Cell Physiol.* 1987, 131, (1), 131-40.

116. Malecki J, Wesche J, Skjerpen C S, Wiedlocha A, Olsnes S. Translocation of FGF-1 and FGF-2 across vesicular membranes occurs during G1-phase by a common mechanism. *Mol Biol Cell.* 2004, 15, (2), 801-14.

117. Coleman A B, Momand J, Kane S E. Basic fibroblast growth factor sensitizes NIH 3T3 cells to apoptosis induced by cisplatin. *Molecular Pharmacology.* 2000, 57, (2), 324-333.

118. Alexander B, Browse D J, Reading S J, Benjamin I S. A simple and accurate mathematical method for calculation of the EC50. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods.* 1999, 41, (2-3), 55-58.

119. Lavrentieva A. Laufende Dissertation. Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover.

120. Samal B B, Arakawa T, Boone T C, Jones T, Prestrelski S J, Narhi L O, Wen J, Stearns G W, Crandall C A, Pope J, et al. High level expression of human leukemia inhibitory factor (LIF) from a synthetic gene in *Escherichia coli* and the physical and biological characterization of the protein. *Biochim Biophys Acta.* 1995, 1260, (1), 27-34.

121. Gearing D P, Nicola N A, Metcalf D. Production of leukaemia inhibitory factor in *Escherichia coli* by a novel procedure and its use in maintaining embryonic stem cells in culture. *BioTechnology.* 1989, 7, 1157-61.

122. Kökpınar Ö. Untersuchung von Membranadsorbersystemen in der Proteinaufreinigung und Entwicklung Aptamer-basierter Affinitätschromatografie. Dissertation. Gottfried Wilhelm Leibniz Universität, Hannover, 2008.

123. Bahnemann N. Produktion von rekombinanten Zytokinen in CHO-Zellkulturen am

Beispiel des human leukemia inhibitory factor. Diplomarbeit. Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, 2009.

124. Moretti P. Laufende Dissertation. Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover.
125. Werner J M, Eger K, Jurgen Steinfeld H. Comparison of the rapid pro-apoptotic effect of trans-beta-nitrostyrenes with delayed apoptosis induced by the standard agent 5-fluorouracil in colon cancer cells. *Apoptosis*. 2007, 12, (1), 235-46.
126. Kaap S, Quentin I, Tamiru D, Shaheen M, Eger K, Steinfeld H J. Structure activity analysis of the pro-apoptotic, antitumor effect of nitrostyrene adducts and related compounds. *Biochem Pharmacol*. 2003, 65, (4), 603-10.
127. Yoshimizu T, Sugiyama N, Felice M D, Ilyeom Y, Ohbo K, Masuko K, Obinata M, Kuniya, Abe, and H R S, Matsui Y. Germline-specific expression of the Oct-4/green fluorescent protein (GFP) transgene in mice. *Develop. Growth Differ*. 1999, 41, 675-684.
128. Carrington J C, Dougherty W G. A viral cleavage site cassette: identification of amino acid sequences required for tobacco etch virus polyprotein processing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988, 85, (10), 3391-5.
129. Dougherty W G, Cary S M, Parks T D. Molecular genetic analysis of a plant virus polyprotein cleavage site: a model. *Virology*. 1989, 171, (2), 356-64.
130. van den Berg S, Lofdahl P A, Hard T, Berglund H. Improved solubility of TEV protease by directed evolution. *J Biotechnol*. 2006, 121, (3), 291-8.
131. Neubacher H. Etablierung der Produktionsbedingungen für die rekombinante Expression und Aufreinigung des Wachstumsfaktors hLIF in *Escherichia coli*. Diplomarbeit. Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, 2009.
132. Bals C. Laufende Dissertation. Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover.
133. Mauritz C, Schwanke K, Reppel M, Neef S, Katsirntaki K, Maier L S, Nguemo F, Menke S, Haustein M, Hescheler J, Hasenfuss G, Martin U. Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells. *Circulation*. 2008, 118, (5), 507-17.
134. Fehling H J, Lacaud G, Kubo A, Kennedy M, Robertson S, Keller G, Kouskoff V. Tracking mesoderm induction and its specification to the hemangioblast during embryonic stem cell differentiation. *Development*. 2003, 130, (17), 4217-27.
135. Stettler M, Zhang X, Hacker D L, De Jesus M, Wurm F M. Novel orbital shake bioreactors for transient production of CHO derived IgGs. *Biotechnol Prog*. 2007, 23, (6), 1340-1346.
136. Anderlei T, Cesana C, Bürki C, De Jesus M, Kühner M, Wurm F, Lohser R, Shaken Bioreactors Provide Culture Alternative. In *Genetic Engineering and Biotechnology News*: Nov. 1, 2009; Vol. 29, No.19  
<http://www.genengnews.com/articles/chtitem.aspx?tid=3092&chid=3>.

137. <http://www.kuhner.com/124341488207-de-index.html>.
138. Jainchill J L, Aaronson S A, Todaro G J. Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. J Virol. 1969, 4, (5), 549-53.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Magda Tomala
Geboren am	20.01.1982 in Krakau, Polen
Einreise nach Deutschland	1985
Nationalität	deutsch

### Schulbildung

1988 - 1992	Grundschule Saturnring, Garbsen
1992 - 1994	Orientierungsstufe, Garbsen
1994 - 2001	Johannes-Kepler-Gymnasium, Garbsen, Abschluss Abitur

### Hochschulstudium

2001 - 2003	Studium Biologie Diplom, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Vordiplom
2003 - 2004	B.Sc. Studium Life Science, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Abschluss Bachelor of Science
2004 - 2006	M.Sc. Studium Life Science, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Abschluss Master of Science
2007 - 2010	Promotion am Institut für Technische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

## Publikationen

*Kultivierungsstrategien für Stammzellen. Entwicklungen zur Bereitstellung von Zell- und Gewebestrukturen für die regenerative Medizin.*

Magda Tomala, Stefanie Böhm und Cornelia Kasper

*BIOforum* 5/2009, S. 30–32

*Preparation of Bioactive Soluble Human Leukemia Inhibitory Factor from recombinant Escherichia coli using Thioredoxin as Fusion Partner.*

Magda Tomala, Antonina Lavrentieva, Pierre Moretti, Ursula Rinas, Cornelia Kasper, Frank Stahl, Axel Schambach, Eva Warlich, Ulrich Martin, Tobias Cantz und Thomas Scheper

*Protein Expr. Purif.*, (2010), Artikel in Druck, doi:10.1016/j.pep.2010.04.002

*Characterization of Dynamic Suspension Cultivation Systems for Embryonic Stem Cell Expansion.*

Magda Tomala, Patrick Lindner, Christian Lüder, Antonina Lavrentieva, Pierre Moretti, Cornelia Kasper, Bernd Hitzmann, Ulrich Martin and Thomas Scheper

Eingereicht in *Biotechnol. Prog.*